

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Jan Rejšek

VYUŽITÍ AMBIENTNÍCH IONIZAČNÍCH TECHNIK V HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRII

The Use of Ambient Ionization Techniques in Mass Spectrometry

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Josef Cvačka, Ph.D.

Praha 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele doc. RNDr. Josefa Cvačky, Ph.D. a že jsem všechny použité prameny řádně citoval. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu a Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd ČR je možné pouze po písemném souhlasu těchto institucí.

V Praze dne

Podpis.....

Abstrakt

Ambientní ionizací v hmotnostní spektrometrii se rozumí ionizace, která probíhá v otevřeném prostoru vně hmotnostního spektrometru a která nevyžaduje žádnou, nebo minimální předúpravu vzorku. V této práci byly používány techniky DESI (desorpční ionizace elektrosprejem) a DAPPI (desorpční fotoionizace za atmosférického tlaku) se softwarově ovládanou polohou sprejeru pro analýzu nízkomolekulárních organických sloučenin. Tyto metody využívají sprejování rozpouštědel k desorpci a ionizaci analytu z pevného substrátu.

Byly nalezeny podmínky pro analýzu fosfolipidů, voskových esterů a několika dalších sloučenin. Byly kvantitativně porovnávány jednotlivé ambientní ionizační techniky při měření různých analytů z různých povrchů. Aplikací bylo HPTLC/DESI-MS směsi lipidů a HPTLC/DAPPI-MS novoroženeckého mázku. DAPPI-MS bylo aplikováno pro analýzu termitů rodu *Prorhinotermes* (Isoptera, Rhinotermitidae). Bylo provedeno pilotní testování plošného vzorku metodou zobrazovací hmotnostní spektrometrie.

Abstract

Ambient ionization technique in mass spectrometry is an ionization, which carries out in open space outside the machine and which does not require any, or only a minimal sample pretreatment. DESI (desorption electrospray ionization) and DAPPI (desorption atmospheric pressure photoionization) equipped with software control of the spray emitter position for analysis of low molecular organic compounds were investigated in this thesis. These methods use a spray of solvents for desorption and ionization molecules from solid substrate.

Conditions for the successful analysis of phospholipids, wax esters and some other compounds were developed. Ambient ionization techniques were quantitatively compared. The application was HPTLC/DESI-MS of lipid's mixture and HPTLC/DAPPI-MS of vernix caseosa. DAPPI-MS was applied for the analysis of termites of *Prorhinotermes* genus (Isoptera, Rhinotermitidae). Pilot experiments of two dimensional analysis and mass spectrometry imaging were realized.

Klíčová slova

ambientní ionizační techniky; hmotnostní spektrometrie; desorpční ionizace elektrosprejem; desorpční fotoionizace za atmosférického tlaku; tenkovrstvá chromatografie, lipidy, zobrazovací hmotnostní spektrometrie

Keywords

ambient ionization techniques; mass spectrometry; desorption electrospray ionization; desorption atmospheric pressure photoionization; thin layer chromatography; lipids, mass spectrometry imaging

Poděkování

Chtěl bych poděkovat svému školiteli doc. RNDr. Josefu Cvačkovi, Ph.D. za vedení, ochotu a cenné rady při vypracovávání této práce. Dále bych chtěl poděkovat RNDr. Filipu Kaftanovi, Ph.D. za zaškolení k samostatnému měření a RNDr. Vladimíru Vrkoslavovi, Ph.D. za praktické rady v průběhu měření. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat všem kolegům ze skupiny Hmotnostní spektrometrie ÚOCHB AV ČR za přátelské pracovní prostředí.

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857 a byla financována z projektů GAČR P206/12/0750 a programu interní podpory projektů mezinárodní spolupráce AV ČR M200551204.

Obsah

1. Úvod	12
2. Cíl práce	15
3. Teoretická část	16
3.1 Ambientní ionizační techniky	16
3.1.1 Dělení ambientních ionizačních technik	18
3.1.2 Ambientní ionizační techniky odvezené od ionizace elektrosprejem	19
3.1.3 Ambientní ionizační techniky odvezené od APPI	23
3.1.4 Ambientní ionizační techniky založené na tvorbě plazmatu	27
3.2 Spojení tenkovrstvé chromatografie a hmotnostní spektrometrie	29
3.2.1 Tenkovrstvá chromatografie	29
3.2.2 TLC/MS	30
3.3 Zobrazovací hmotnostní spektrometrie za ambientních podmínek	37
3.4 Lipidy	38
3.4.1 Novorozenecký mázek – vernix caseosa	39
4. Experimentální část	40
4.1 Použité chemikálie	40
4.2 Použitý materiál	41
4.2.1 Povrchy pro DESI/DAPPI	42
4.3 Přístroje a zařízení	42
4.3.1 LCQ Fleet	42
4.3.2 DESI/DAPPI zdroj pro ambientní ionizaci	43
4.3.3 Softwarově ovládaná motorizovaná platforma	45
4.3.4 Ostatní přístroje	45
4.4 Seznam analyzovaných látek a objektů	45

4.4.1 Lipidy	45
4.4.2 Ostatní	48
4.5 Experimentální podmínky, metodika měření a zpracování výsledků	50
4.5.1 Neměnné/fixní experimentální podmínky	50
4.5.2 Měnicí se/variabilní experimentální podmínky	50
4.5.3 Hmotnostně-spektrometrická analýza z jednoho bodu, podél linie a plochy	51
4.5.4 Zpracování a zobrazování výsledků	54
4.5.5 Tenkovrstvá chromatografie	54
4.5.6 Určení meze detekce a meze stanovitelnosti	54
5. Výsledky a diskuze	56
5.1 Testování platformy	56
5.1.1 DESI ⁺ rhodaminu B	56
5.1.2 DESI ⁺ kofeinu	58
5.2 Analýza fosfolipidů	59
5.2.1 DESI ⁺ na Teflonové desce	59
5.2.2 DESI ⁻ na Teflonové desce	61
5.2.3 DESI ⁺ na Teflonové fólii	63
5.2.4 DESI ⁻ na Teflonové fólii	65
5.2.5 DESI ⁺ na plexiskle	66
5.2.6 DESI ⁻ na plexiskle	68
5.2.7 DESI ⁻ na TLC desce	69
5.2.8 DESI ⁻ na HPTLC desce	71
5.2.9 Porovnání vhodnosti povrchů na základě absolutních hodnot intenzit signálů při DESI ⁺ a DESI ⁻ analýze fosfolipidů	73
5.3. Analýza triacylglycerolů, voskových esterů a mastné kyseliny	74
5.3.1 DESI ⁺ na Teflonové desce	74
5.3.2 DESI ⁻ na Teflonové desce (analýza z jednoho bodu)	76
5.3.3 DESI ⁺ na Teflonové fólii	77
5.3.4 DESI ⁺ na plexiskle	78
5.3.5 DESI ⁺ na TLC desce	80

5.3.6 DESI ⁺ na HPTLC desce	82
5.3.7 Porovnání vhodnosti povrchů na základě absolutních hodnot intenzit signálů při DESI ⁺ analýze triacylglycerolů	83
5.3.8 DAPPI ⁺ na Teflonové desce	84
5.3.9 DAPPI ⁺ na plexiskle	88
5.3.10 Porovnání vhodnosti povrchů na základě absolutních hodnot intenzit signálů při DAPPI ⁺ analýze triacylglycerolů a voskových esterů	91
5.4 Mez detekce a mez stanovitelnosti	92
5.5. Analýza novorozeneckého mázku z jednoho bodu a podél linie bez předcházející chromatografické separace	95
5.6 HPTLC/DESI-MS	96
5.7 HPTLC/DAPPI-MS	100
5.8 Analýza termitů rodu <i>Prorhinotermes</i> (Isoptera, Rhinotermitidae)	102
5.9 Analýza plochy	104
6. Závěr	107

Seznam použitých symbolů a zkratek

AP-MALDI	Desorpce/ionizace laserem za spoluúčasti matrice za atmosférického tlaku
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
API	Ionizace za atmosférického tlaku
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku
ASAP	Atmospheric solids analysis probe
AU	Arbitrární jednotka
CER	Cerebrosid
CI	Chemická ionizace
CID	Kolizně indukovaná disociace
DAPCI	Desorpční chemická ionizace za atmosférického tlaku
DAPPI	Desorpční fotoionizace za atmosférického tlaku
DART	Přímá analýza v reálném čase (Direct analysis in real time)
DBDI	Dielectric barrier discharge ionization
DESI	Desorpční ionizace elektrosprejem
DI	Desorpce/ionizace
DIP	Sonda pro přímý vstup
EA	Elektronová afinita
EASI	Easy ambient sonic-spray ionization
EESI	Extractive electrospray ionization
EI	Elektronová ionizace
ELDI	Electrospray-assisted laser desorption ionization
ESI	Ionizace elektrosprejem

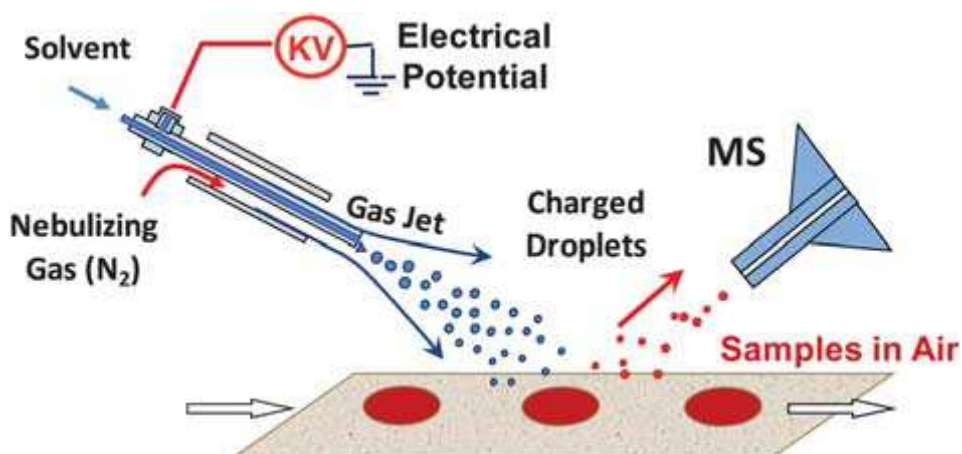
FA-APGDI	Flowing afterglow-atmospheric pressure glow discharge
FAB	Ionizace urychlenými atomy (Fast atom bombardement)
GDI	Ionizace doutnavým výbojem
HPTLC	Vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie
HV	Vysoké napětí
ICP	Indukčně vázané plazma
IE	Ionizační energie
IR-LADESI	Infrared laser-assisted desorption ESI
LAESI	Laser-assisted ESI
LDI	Desorpční ionizace laserem
LSIMS	Liquid secondary ion mass spectrometry
LTP	Low-temperature plasma ionization
MALDESI	Matrix-assisted laser desorption electrospray ionization
MALDI	Desorpce/ionizace laserem za spoluúčasti matrice
ME-TLC	Mikroemulzní tenkovrstvá chromatografie
MSI	Zobrazovací hmotnostní spektrometrie
MTBE	Methyl- <i>t</i> -butyl ether
ND-EESI	Neutral desorption EESI
OPLC	Overpressured layer chromatography
PA	Protonová afinita/Kyselina fosfatidová
PADI	Plasma-assisted desorption/ionization
<i>lyso</i> -PC	<i>lyso</i> -Fosfatidylcholin
PE	Fosfatidylethanolamin

PI	Fotoionizace
PMMA	Polymethylmetakrylát
PS	Fosfatidylserin
PSI	Paper spray ionization
PTFE	Polytetrafluorethylen
R_F	Retardační faktor
SALDI	Surface-assisted laser desorption/ionization
SIMS	Hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů
SM	Sfingomyelin
ST	Cerebrosid sulfát
SSI	Sonic spray ionization
UTLC	Ultra tenkovrstvá chromatografie
V-EASI	Venturi easy ambient sonic-spray ionization
VC	Novorozenecký mázek (Vernix caseosa)

1. Úvod

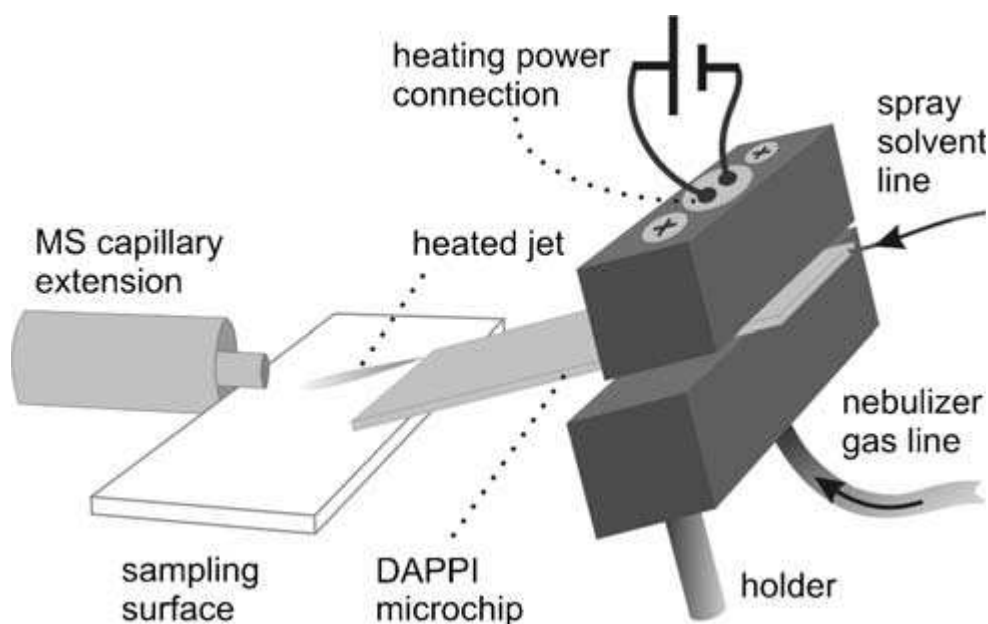
Ambientní ionizací v hmotnostní spektrometrii se rozumí ionizace, která probíhá v otevřeném prostoru vně hmotnostního spektrometru.¹ V dnešní době je známo asi 30 typů ambientních ionizačních technik.² Jejich hlavními výhodami jsou rychlost analýzy a fakt, že nevyžadují předúpravu vzorku. Z definice vyplývá, že můžeme analyzovat běžné objekty v otevřené atmosféře laboratoře, nebo i v přírodě.

Vynález ionizace elektrosprejem poskytl účinnou možnost oddělení analytů z roztoku a přenos volných iontů z atmosférického tlaku do vysokého vakua hmotnostního spektrometru.³ MALDI (desorpce/ionizace laserem za spoluúčasti matrice) umožňuje zkoumat analyty rozptýlené v kondenzované matrici rovněž za atmosférického tlaku (AP-MALDI).⁴ Podobně i ostatní ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku jako APCI (chemická ionizace za atmosférického tlaku) a APPI (fotoionizace za atmosférického tlaku) podstatně zjednodušily analýzu a umožnily výzkum nových typů vzorků pomocí hmotnostní spektrometrie. Stále ale vyžadovaly úpravu vzorku a následné rozpuštění, respektive zakotvení na vhodné matrici. Ambientní ionizační techniky tento problém překonaly a umožnily analyzovat objekty v přirozeném prostředí za přirozených podmínek bez složité předúpravy. Představují tedy přímé spojení mezi pevným objektem v otevřené atmosféře a volnými ionty ve vakuu hmotnostního spektrometru. Fundamentálními procesy těchto technik jsou desorpce a ionizace.



Obr. 1.1 Schéma DESI (převzato z Ifa, D. R.; Wu, C.; Ouyang, Z.; Cooks, R. G. *Analyst* **2010**, *135*, 669–681).

V této práci byly vyvíjeny techniky DESI (desorpční ionizace elektrosprejem)⁵ a DAPPI (desorpční fotoionizace za atmosférického tlaku).⁶ Principem DESI (Obr. 1.1) je extrakce analytu z povrchu do tenkého kapalného filmu vytvořeného na vzorkovaném povrchu pomocí spreje jemných nabitých kapiček. Následně dochází k přenosu sekundárních kapiček vzniklých dopadem primárního spreje tzv. „droplet pick-up“ mechanismem do hmotnostního spektrometru.⁷ Desorpce a ionizace probíhají v jednom kroku. DESI patří do metod odvozených od ESI.



Obr. 1.2 Schéma DAPPI (převzato z Luosujärvi, L.; Kanerva, S.; Saarela, V.; Franssila, S.; Kostiainen, R.; Kotiaho, T.; Kauppila, T. J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, 24, 1343–1350).

Principem DAPPI (Obr. 1.2) je desorpce analytu z povrchu pomocí směsi zmlžovacího plynu a par sprejovaného rozpouštědla a následná fotoionizace a molekulárně-iontové reakce analytu v plynné fázi.⁸ DAPPI patří do metod odvozených od APPI.

Lipidy jsou deriváty vyšších mastných kyselin a alifatických, či alicyklických hydroxy- nebo aminosloučenin.⁹ Tvoří skupinu chemicky i funkčně nesourodých přírodních látek. Jsou součástí živočišné i rostlinné tkáně a jsou jak vydatnou zásobárnou energie, tak i stavebními látkami buněčných membrán.

Jednou z na lipidy bohatých živočišných tkání je i novorozenecský mázek.¹⁰ Je známo, že jednou z jeho funkcí je ochrana před bakteriální infekcí. Přesto není jeho

přesná role v lidském organismu zcela objasněna, a proto je důležité určit i jeho chemické složení. Možným přístupem analýzy jsou právě ambientní ionizační techniky.

Ambientní ionizace rovněž umožňuje analyzovat živé organismy jako je hmyz, v reálném čase, například sledovat vylučované obranné látky při vnějším zásahu. Tyto studie přináší poznatky chemické ekologii hmyzu, což je disciplína, která se prostřednictvím chemické analýzy komunikačních látek zabývá chováním hmyzu např. při výběru partnera, nebo při své obraně.¹¹

Ambientní ionizační techniky již byly použity například ve forenzní analýze, metabolomice, lipidomice, při analýze léčiv, proteinů i uhlovodíků.^{12,13}

Mezi mnohými aplikacemi ambientních ionizačních technik stojí za zdůraznění *in situ* stopová organická analýza a zobrazovací hmotnostní spektrometrie. *In situ* organická analýza vyžaduje přenosné, mobilní, spolehlivé a automatizované hmotnostní spektrometry, které mohou najít využití zejména při ochraně zdraví a veřejného pořádku.¹⁴ Zobrazovací hmotnostní spektrometrie se používá pro znázornění prostorové distribuce chemických sloučenin v různých objektech a využití nachází například v lékařství.¹⁵

2. Cíl práce

Tato práce je součástí projektů, které se zabývají spojením ambientních ionizačních technik s tenkovrstvou chromatografií a jejich následnou aplikací pro analýzu přírodních látek. Vyvíjenými ambientními ionizačními technikami byly DESI a DAPPI a zkoumanými chemickými sloučeninami nízkomolekulární organické molekuly a to zejména přírodní látky jako lipidy obsažené v živočišné a rostlinné tkáni, identifikovatelné například při analýze hmyzu a novorozeneckého mázku (*vernix caseosa*). Hmyzí organismus je z chemického pohledu složitým systémem obsahujícím široké spektrum látek od nízkomolekulárních těkavých sloučenin až po proteiny plnící různé funkce. Novorozenecký mázek je bílá, krémovitá hmota, kterou je lidský plod obalen poslední tři měsíce těhotenství. Je to komplexní biologická matrice obsahující bohatou směs látek lipidové povahy.

Cílem této práce je:

- Otestovat motorizovanou platformu pro kontinuální sběr hmotnostně-spektrometrických dat v podélné ose vzorku.
- Porovnat a otestovat DESI a DAPPI při analýze různých nízkomolekulárních látek jako jsou voskové estery, triacylglyceroly a fosfolipidy.
- Porovnat ionizační účinnost a citlivost při analýze z různých povrchů jako je sklo, Teflonová deska, Teflonová folie a plexisklo.
- Použít ambientní ionizační techniky k detekci analytů z TLC a HPTLC desek po chromatografické separaci.
- Otestovat zobrazovací DESI-MS a DAPPI-MS.

3. Teoretická část

3.1 Ambientní ionizační techniky

Ambientní ionizační techniky na rozdíl od ostatních ionizačních zdrojů používaných v hmotnostní spektrometrii splňují následující podmínky.¹⁶ (a) Umožňují přímou analýzu objektu bez jakékoliv (nebo minimální) předúpravy vzorku, jako je prekoncentrace, extrakce, derivatizace, rozpuštění, chromatografická, či elektroforetická separace. (b) Jsou kompatibilní téměř se všemi typy hmotnostních spektrometrů nezávisle na používaném hmotnostním analyzátoru, iontové optice, či vakuovém systému. (c) Patří mezi měkké ionizační techniky, to znamená, že generované ionty mají obdobnou vnitřní energii jako při jiných API (ionizace za atmosférického tlaku) technikách ESI, APCI, APPI apod. Během posledních 20 let komerční dostupnost API technik výrazně rozšířila seznam látek analyzovaných hmotnostní spektrometrií. Tyto ionizace probíhající za atmosférického tlaku umožnily transportovat připravený vzorek do vakua hmotnostního spektrometru. ESI umožnila pomocí odpařování rozpouštědla a řízeného přechodu analytu na populaci volných iontů v plynné fázi analyzovat i vysokomolekulární látky jako jsou proteiny a takéž umožnila účinné spojení hmotnostního spektrometru s kapalinovým chromatografem. Při použití ESI zdroje jsou ionizovány molekuly přítomné v roztoku procesem protonace $[M+H]^+$, deprotonace $[M-H]^-$, kationizace, např. $[M+Na]^+$, či anionizace, např. $[M+Cl]^-$ a vzniklé ionty jsou sprejovány za vzniku jemného aerosolu nabitých kapiček. Tyto ionty prakticky nepodléhají fragmentaci, stále ale platí omezení pro analýzu pouze kapalné fáze. Další ionizační technika MALDI, která je vhodná zejména pro peptidy, proteiny, oligonukleotidy a polymery, umožňuje analýzu objektů v kondenzované fázi za vakua i za atmosférického tlaku (AP-MALDI), ale vyžaduje předúpravu vzorku jako je rozpuštění a zakotvení na vhodné matrici. SIMS (hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů) naproti tomu umožňuje analýzu pevných vzorků, ale pouze za sníženého tlaku. Ačkoliv API techniky významně zjednodušily MS analýzu, stále vyžadují přípravu vhodného roztoku, jež zahrnuje více kroků (separace, derivatizace atd.), které mohou způsobit chemické interference a porušit přirozené složení analyzovaného objektu i prostorovou distribuci analytu ve vzorku.

Většina ambientních ionizačních technik pracuje na principu desorpce/ionizace (DI). Umožňují rychlou, selektivní, vysoce citlivou kvalitativní i kvantitativní chemickou a biochemickou analýzu v kombinaci s jednoduchostí používání. V současnosti známe asi 30 těchto technik, které se mnohdy liší pouze v jemných detailech. Zdaleka nejpoužívanějšími jsou DESI a DART (přímá analýza v reálném čase),^{5,17} jejichž uvedení v roce 2004, respektive 2005 otevřely nové pole hmotnostní spektrometrie, ambientní ionizaci. Tab. 3.1 podává přehled o nejrozšířenějších technikách chronologicky seřazených tak, jak byly poprvé publikovány.

Tab. 3.1 Souhrn nejrozšířenějších ambientních ionizačních technik.

akronym	popis	rok	cítace
DESI	Desorption electrospray ionization	2004	cit. 5
DART	Direct analysis in real time	2005	cit. 17
ASAP	Atmospheric solids analysis probe	2005	cit. 18
DAPCI	Desorption atmospheric pressure chemical ionization	2006	cit. 19
EASI	Easy ambient sonic-spray ionization	2006	cit. 20
EESI	Extractive electrospray ionization	2006	cit. 21
ELDI	Electrospray-assisted laser desorption ionization	2006	cit. 22
MALDESI	Matrix-assisted laser desorption electrospray ionization	2006	cit. 23
ND-EESI	Neutral desorption EESI	2007	cit. 24
DAPPI	Desorption atmospheric pressure photon ionization	2007	cit. 6
PADI	Plasma-assisted desorption/ionization	2007	cit. 25
DBDI	Dielectric barrier discharge ionization	2007	cit. 26
LAESI	Laser-assisted ESI	2007	cit. 27
FA-APGDI	Flowing afterglow-atmospheric pressure glow discharge	2008	cit. 28
IR-LADESI	Infrared laser-assisted desorption ESI	2008	cit. 29
LTP	Low-temperature plasma ionization	2008	cit. 30
PSI	Paper spray ionization	2010	cit. 31

3.1.1 Dělení ambientních ionizačních technik

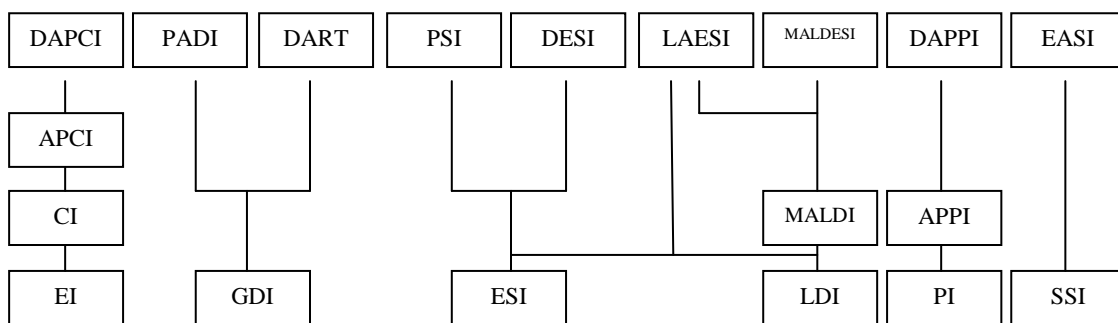
V současnosti neexistuje jednotné, zavedené členění ambientních ionizačních technik a lze je proto dělit více způsoby na základě různých kritérií.

Tab. 3.2 ukazuje dělení podle fyzikálně-chemickým mechanismů a metod procesů desorpce a ionizace.³²

Tab. 3.2 Rozdělení ambientních ionizačních technik podle fyzikálně chemických mechanismů a metod procesů desorpce a ionizace.

desorpce		ionizace	příklad
mechanismus	činitel		
desorpce kinetickou energií	sprejovací kapalina	ESI	DESI
desorpce kinetickou energií	průtok plynu	ESI	ND-EESI
desorpce kinetickou energií	průtok plynu	CI	DBDI
vysokoenergetická aktivace	laser	ESI	ELDI, LAESI
termální desorpce	průtok ohřátého plynu	CI	ASAP, DART, DAPCI, PADI
termální desorpce	průtok ohřátého plynu	PI	DAPPI

Jiný způsob dělení ambientních ionizačních technik na základě rozdílných ionizačních mechanismů je znázorněn pomocí hierarchického diagramu na Obr. 3.1.³³



Obr. 3.1 Rozdělení ambientních ionizačních technik podle ionizačních mechanismů.

3.1.2 Ambientní ionizační techniky odvozené od ionizace elektrosprejem

Techniky odvozené od ESI jsou vhodné pro analýzu středně polárních a polárních látek. Ionizace probíhá převážně přes:

- tvorbu aduktů v pozitivním i negativním módu (př. $[M+H]^+$, $[M+Cl]^-$)
- přímé uvolnění intaktních kationtů a aniontů ze solí
- deprotonaci v negativním módu - $[M-H]^-$

V prvním kroku jsou molekuly analytu desorbovány/vzorkovány z pevného, nebo kapalného objektu a následně transportovány do hmotnostního spektrometru v odpařujících se nabitých kapičkách. Ionizace probíhá ESI mechanismem, s ionty převedenými z nabitých kapiček do plynné fáze zbytkovým nábojem (charge residue) nebo vypařením iontů (ion evaporation).

Hlavní výhodou této skupiny ambientních ionizačních technik je jejich schopnost vzorkovat molekuly přímo z povrchu analyzovaného objektu S-L (pevná fáze-kapalná fáze) extrakcí bez předúpravy vzorku (rozpuštění) jako v případě ESI. Navíc můžeme v ambientních podmínkách zkoumat chemické složení vzorku na různých místech analyzovaného objektu.

Jednotlivé techniky v této kategorii se navzájem liší ve způsobu vzorkování povrchu, respektive v procesu desorpce.

3.1.2.1 DESI

DESI je jednoznačně nejpoužívanější a nejrozšířenější ambientní ionizační technikou, která již byla aplikována na nespočetné množství vzorků a směsí. Analyty mohou být zkoumány buď přímo z přirozené (biologické) matrice (např. kůže, mozek), nebo mohou být umístěné na pomocném povrchu (např. sklo, papír, kov, TLC). Je jednou z nejuniverzálnějších technik umožňující analyzovat široké pole molekul od nízkomolekulárních až po biomolekuly. V nedávné době se dokonce pomocí *in situ* derivatizace podařilo analyzovat nepolární uhlovodíky.³⁴

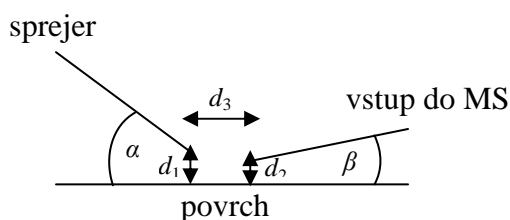
Mechanismus

Sprej jemných, nabitých kapiček rozpouštědla z elektrospreje dopadá na analyzovaný objekt. Kapičky mají průměr 3 μm a rychlost 150 ms^{-1} .³⁵ K desorpci analytu dochází tzv. „droplet pick-up“ mechanismem, kdy na povrchu dojde nejprve

k vytvoření tenkého filmu sprejované kapaliny, následně k rozpuštění analytu a nárazem sprejovaných kapiček k vytváření velkého množství nabitých sub- μm sekundárních mikrokapiček. Tyto kapičky jsou následně ionizovány ESI mechanismem a transportovány do hmotnostního spektrometru. Simulace ukázaly, že nárazem jedné kapičky do tenké vrstvy kapalného filmu dochází k vyražení desítek sekundárních mikrokapiček.³⁶

Podmínky měření a instrumentace

1) *Geometrické uspořádání.* Základem instrumentace DESI je geometrické uspořádání, které představuje elektrosprej umístěný v relativní poloze vůči analyzovanému povrchu a vstupu do hmotnostního spektrometru (Obr. 3.2). Toto geometrické uspořádání lze popsat veličinami úhel dopadu α , úhel tvořený vstupem do hmotnostního spektrometru a povrchem β , vzdáleností mezi sprejerem a povrchem d_1 , vzdáleností mezi vstupem do hmotnostního spektrometru a povrchem d_2 a vzdáleností mezi sprejerem a vstupem do hmotnostního spektrometru d_3 .



Obr 3.2 Schéma geometrického uspořádání DESI.

2) *Podmínky sprejování.* Průtok zmlžujícího plynu a rozpouštědla. Napětí vložené na kapiláru.

3) *Chemické podmínky.* Použité rozpouštědlo a případná aditiva.

4) *Povrch.* Typ použitého povrchu (sklo, papír, polymer...).

Účinnost DESI závisí jednak na desorpci analytu z povrchu a jeho transportu do hmotnostního spektrometru, tak i na procesu ionizace. Veličiny α a d_1 ovlivňují přímo ionizaci, zatímco veličiny β a d_2 obvykle citlivost metody.

Podmínky sprejování určují velikost, náboj a rychlost vznikajících kapiček. Vyšší průtok zmlžovacího plynu snižuje velikost kapiček, ale zvyšuje jejich rychlost. Tento fenomén je do určité míry výhodný (protože podporuje desolvataci), po jejím překročení ale může docházet k předčasnému odpařování, které snižuje účinnost DESI.³⁷ Vyšší průtok rozpouštědla způsobuje tvorbu větších kapiček, v krajním případě může dojít k nadměrnému nahromadění kapaliny na povrchu. Podobně jako v ESI, je nutno přizpůsobit složení rozpouštědla měřenému analytu. Nejběžnějšími rozpouštědly jsou methanol, voda, acetonitril a jejich kombinace, nejběžnějšími aditivy pak kyselina mravenčí, amoniak, octan amonný apod.

Elektrická vodivost použitého povrchu ovlivňuje přímo ionizaci.³⁸ DESI mechanismus zahrnuje tvorbu nabitých kapiček, proto musí být zabráněno jejich vybíjení, používají se proto výhradně elektrické izolanty. Elektrostatické vlastnosti povrchu jsou velmi důležité a ovlivňují například stabilitu signálu. Významnou vlastností je rovněž afinita analytu k povrchu. Čím je tato afinita větší, tím je účinnost DESI nižší, protože dochází k znesnadnění desorpce. Proto se s výhodou používají polymerní materiály jako Teflon, či plexisklo.

DESI zdroj může v hmotnostním spektrometru jednoduše nahradit API zdroj, a je proto kompatibilní s téměř všemi typy hmotnostních analyzátorů (např. lineární trojitý kvadrupól, iontová past, orbitrap, hybridní typy analyzátorů jako kvadrupól-průletový analyzátor). Můžeme jej rovněž používat v tandemové hmotnostní spektrometrii.

Základní analytické parametry DESI již byly také studovány. Limit detekce pro malé molekuly byl publikován jako 1 až 10 fmol a reprodukovatelnost kvantitativních dat 5-10 %.³⁹

Aplikace

DESI již byla aplikována pro rychlou analýzu farmaceutických produktů,⁴⁰ výbušnin,⁴¹ pro biologické zobrazování,⁴² pro forenzní zobrazování inkoustů⁴³ a padělků,⁴⁴ pro léčiva v komplexních biologických matricích,⁴⁵ bojové látky,⁴⁶ textil,⁴⁷ peptidy⁴⁸ a proteiny,⁴⁹ v proteomice,¹² metabolomice¹³ a tenkovrstvé chromatografii,⁵⁰ pro analýzu rostlin,⁵¹ přírodních produktů,⁵² kapalných vzorků⁵³ a mikroorganismů *in vivo*,⁵⁴ sledování životního prostředí⁵⁵ a polymerů.⁵⁶

Reaktivní DESI

Přidáním reagentu ke sprejovanému rozpouštědлу může být významně zvýšena chemická selektivita DESI ionizace, zvláště směrem k méně polárním analytům.

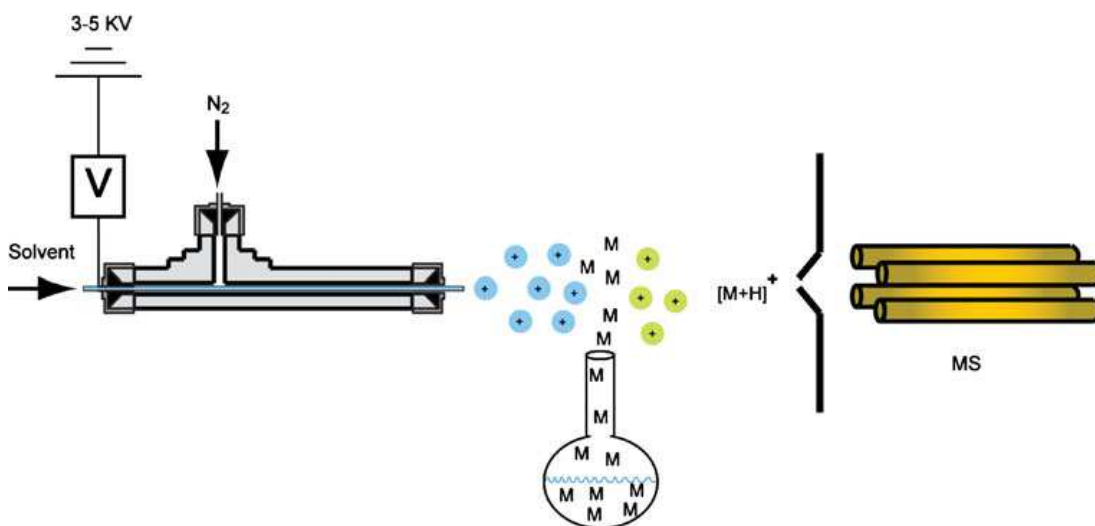
Například při analýze tkáně sprejovací kapalinou methanol/voda není pozorován žádný signál cholesterolu. Po přidání betain aldehydu do sprejovací fáze získáme velice intenzivní odezvu reakčního produktu.⁵⁷

Na rozdíl od jednoduché adukce kationtů a aniontů jsou při reaktivním DESI využívány redoxní reakce, interakce hostitel-host, obecně chemické reakce probíhající v roztocích.

Elektrochemie

Stejně jako v ESI, jsou elektrochemické procesy součástí i DESI. Obecně lze ale tvrdit, že v DESI tyto procesy nejsou příliš významné (pozn. oxidace je běžnější než redukce) a výsledné hmotnostní spektrum výrazně ovlivňují pouze v případě jednoduše oxidovatelných, či redukovatelných látek, např. 1,4-benzochinonu.⁵⁸

3.1.2.2 EESI



Obr. 3.3 Schéma EESI (převzato z Alberici, R. M.; Simas, R. C.; Sanvido, G. B.; Romão, W.; Lalli, P. M.; Benassi, M.; Cunha, I. B. S.; Eberlin, M. N. *Anal. Bional. Chem.* **2010**, 398, 265–294).

V DESI je analyt nejprve desorbován/ionizován z povrchu pomocí sprejovaných kapiček a následně transportován do hmotnostního spektrometru. Těžké analyty proto bývá někde těžké detekovat, protože se z povrchu velice rychle

odpařují. EESI (extractive electrospray ionization) řeší tyto nedostatky DESI a zaměřuje se na analýzu těkavých látek. Při EESI jsou páry nebo jemný sprej neutrálních kapiček molekul analytu rozptýleny do proudu nabitých kapiček rozpouštědla produkovaných elektrosprejem a ionizovány ESI-mechanismem. Jednou z výhod EESI je odstranění efektů potlačování ionizace způsobené matricí vzorku.

Pro méně polární analyty, které nejsou dostatečně ionizovány nabitými kapičkami z elektrospreje, byla použita ionizace pomocí Ag^+ .⁵⁹ EESI bylo úspěšně aplikováno pro detekci těkavých analytů ve vzorcích jako mléko, ovoce, výbušniny, zubní pasta a olivový olej.⁶⁰

3.1.3 Ambientní ionizační techniky odvezené od APPI

Jedinou ambientní ionizační technikou z této skupiny je DAPPI, která byla experimentálně studována v rámci této práce.

3.1.4.1 DAPPI

DAPPI zahrnuje tepelnou desorpci analytu z povrchu a fotoionizaci (podobně jako APPI). Základem instrumentace je mikročip s elektrickým ohřevem sprejující směs par rozpouštědla a zmlžovacího plynu.⁶¹ Nejčastěji používanými rozpouštědly jsou toluen a aceton, jež se účastní fotoionizace, nebo protonace analytu díky ion-molekulárním reakcím v plynné fázi.⁶² Kryptonová lampy je umístěna tak, aby ozařovala místo desorpce. Produkuje UV fotony s vysokou energií (10 eV), které mohou také přímo desorbovat molekuly. Nejčastěji pozorovanými ionty jsou molekulární ionty a protonované molekuly látek s vysokou protonovou afinitou.

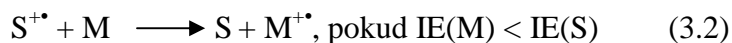
Mechanismus

Princip DAPPI není zatím zcela objasněn, přesto se dá říci, že mechanismus desorpce a ionizace je kombinací tepelných a chemických procesů.⁸ Směs par rozpouštědla a zmlžovacího plynu je mikročipem sprejována na analyzovaný objekt, který je ozařován kryptonovou UV lampou. Protože se zvyšující se teplotou sprejované směsi dochází ke zvýšení intenzity signálu, lze usuzovat na tepelnou desorpci, i když například rozpustnost analyzovaných molekul v rozpouštědle může

desorpci také ovlivnit. Ionizace je obdobná jako v APPI⁶³ (fotoionizace za atmosférického tlaku). Jde o fotoionizaci v přítomnosti dopantu (rozpouštědlo-aceton, toluen, anisol atd.) a ion-molekulární reakce v plynné fázi.⁶² Fotony emitované UV lampou iniciují proces ionizace tvorbou elektricky nabitých molekul rozpouštědla a termálních elektronů (Rovnice (3.1)) a rovněž také podporují desorpci molekul analytu.



Následně probíhají ion-molekulární reakce v plynné fázi obdobné APPI, například:



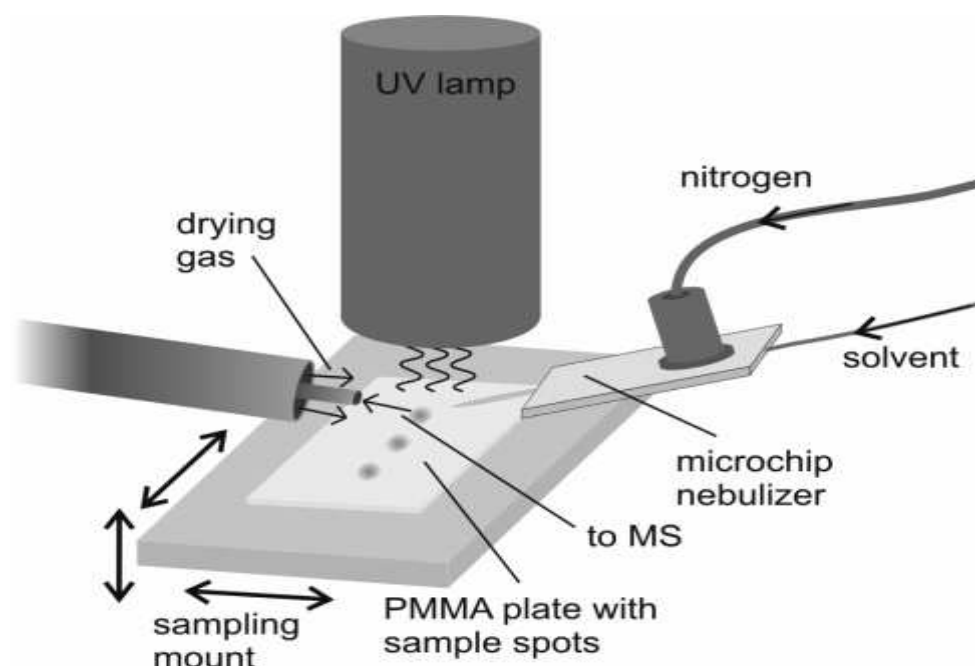
Při ionizaci v pozitivním módu jsou molekuly ionizovány buď přenosem protonu, pokud je PA (protonová afinita) analytu vyšší než PA interagujícího iontu, anebo výměnou náboje, pokud je IE (ionizační energie) analytu nižší než IE interagujícího iontu.⁶⁴ Je proto možné ionizovat molekuly s nízkou PA výměnou náboje, pokud mají dostatečně nízkou IE. Nejobvyklejšími ionty ve spektru pak jsou $[M+H]^+$, $M^{+\bullet}$ a $[M-H]^+$.

Při ionizaci v negativním módu jsou molekuly ionizovány buď přenosem protonu, pokud je disociační konstanta analytu v plynné fázi vyšší než disociační konstanta interagujícího iontu, anebo elektronovým záchytem, či výměnou náboje, pokud je EA (elektronová afinita) analytu vyšší než interagujícího iontu.⁶⁴ Termální elektrony vznikající při fotoionizaci jsou zachyceny sloučeninami s pozitivní hodnotou EA. Kyslík, jenž má $EA = 0,45 \text{ eV}$, je v DAPPI vždy přítomen (jde o ambientní ionizační techniku) a vytváří superoxidový anion $O_2^{\bullet-}$, který může následně také ionizovat molekuly analytu. Nejobvyklejšími ionty ve spektru pak jsou $[M-H]^{-}$, $M^{\bullet-}$ a $[M+Cl]^{-}$.

V hmotnostním spektru můžeme často pozorovat i produkty oxidace korespondující s adicí jednoho, nebo více atomů kyslíku. Oxidaci způsobují částice jako reaktivní neutrální radikály, atomární kyslík, hydroxylový radikál apod., které vznikají fotolýzou O_2 a H_2O , jež jsou přítomné v atmosféře a v párách rozpouštědla.⁶⁵

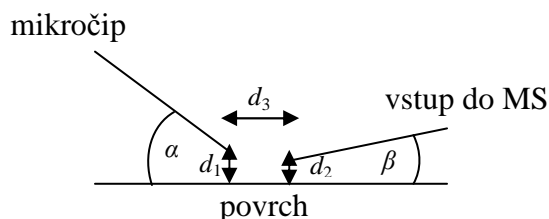
Podmínky měření a instrumentace

1) *Mikročip*. Typ používaného mikročipu a způsob jeho výroby výrazně ovlivňují měření.



Obr. 3.4 Schéma DAPPI (převzato z Haapala, M.; Pol, J.; Saarela, V.; et al. *Anal. Chem.* **2007**, 79, 7867–7872).

2) *Geometrické uspořádání*. Základem instrumentace DAPPI je geometrické uspořádání, které představuje mikročip umístěný v relativní poloze vůči analyzovanému povrchu a vstupu do hmotnostního spektrometru (Obr. 3.5) a poloha kryptonové UV lampy ozařující analyzovaný objekt fotony o energii 10 eV. Toto geometrické uspořádání lze popsat veličinami úhel dopadu α , úhel tvořený vstupem do hmotnostního spektrometru a povrchem β , vzdáleností mezi sprejerem a povrchem d_1 , vzdáleností mezi vstupem do hmotnostního spektrometru a povrchem d_2 , vzdáleností mezi sprejerem a vstupem do hmotnostního spektrometru d_3 .



Obr 3.5 Schéma geometrického uspořádání DAPPI.

3) *Směs zmlžovacího plynu a par rozpouštědla a teplota.* Průtok zmlžovacího plynu a rozpouštědla. Příkon externího ohřívání mikročipu.

4) *Chemické podmínky.* Použité rozpouštědlo a případná aditiva.

5) *Povrch.* Typ použitého povrchu (sklo, papír, polymer...).

Mikročip se skládá ze dvou spojených skleněných destiček. Přívod rozpouštědla, vstup pro plyn, odpařovací drážka a tryska jsou vyryty na vrchní destičce. Platinové topné těleso je začleněno na spodní destičce. Rozpouštědlo vstupující do mikročipu křemennou kapilárou je míseno se zmlžovacím plynem v odpařovací drážce. Tryska vytváří úzký proud par rozpouštědla a zmlžovacího plynu.

Ve srovnání s DESI se používá nižší průtok plynu a to asi 180 ml/min. Při tomto nastavení průtoku plynu je proud aplikované směsi úzký a ohraničený, což zaručuje, že je vzorkované místo analyzovaného objektu dobře lokalizované. Rychlost sprejované směsi je při ústí spreje 30 m/s,⁸ zatímco při DESI je průměrná rychlost kapiček 120 m/s. Nižší kinetická energie proudu směsi par rozpouštědla a zmlžovacího plynu ve srovnání s DESI sprejem nesnižuje účinnost desorpce, protože ta je řízena termálně.

Bylo zjištěno, že při průtoku rozpouštědla vyšším než 8 μ l/min se již ionizační účinnost nezvyšuje, což odpovídá skutečnosti, že určité množství dopantu je nutné pro efektní ionizace, jeho nadbytek ale již k dalšímu zlepšení nepřispívá.⁸

Použití vyhřívaného čipu umožňuje rychlé upravování teploty, což umožňuje aplikovat dle potřeby různé teploty pro různé analyty. Aplikovaná směs může být zahřána až na 350 °C, přičemž tato horní hranice je dána odolností platinového topného tělesa. Čím je vyšší teplota rozprašované směsi, tím je vyšší intenzita signálu. Čím je vyšší bod varu sloučeniny, tím více tepelné energie je potřeba.

Volbou rozpouštědla (stejně jako v APPI) je možné ovlivnit selektivitu metody a způsob ionizace.⁶⁴ Při ionizaci v pozitivním módu anisol a toluen podporují tvorbu M^{+} , a jsou proto vhodné pro analýzu nepolárních sloučenin. Anisol a toluen mají nízké IE, a proto snadno tvoří kationradikály, které následně podstupují proces výměny náboje s molekulami analytu. Aceton, hexan, 2-propanol a methanol podporují tvorbu $[M + H]^+$, a jsou proto vhodné pro analýzu polárních sloučenin. Ionizace v tomto případě probíhá přenosem protonu. V negativním ionizačním módu ovlivňuje rozpouštědlo intenzitu signálu iontu, ale ne jeho strukturu.

Typ povrchu má velký vliv na intenzitu měřeného signálu. Bylo zjištěno, že nejlepší vlastnosti pro měření mají polymerní materiály jako PMMA (polymethylmetakrylát) a PTFE (polytetrafluorethylen) díky jejich nízké tepelné vodivosti, která způsobuje účinnější ohřev vzorkovaného místa.⁶⁴ Sklo a papír poskytují postačující odezvy pouze v pozitivním ionizačním módu. Materiál povrchu pravděpodobně neovlivňuje typ ionizačního procesu, ale jeho účinnost, jež závisí na fyzikálních faktorech jako morfologie a mikrostruktura.

Aplikace

DAPPI bylo použito pro analýzu pesticidů,⁶⁶ polyaromatických uhlovodíků⁶⁶ a návykových látek.⁶⁷

3.1.4 Ambientní ionizační techniky založené na tvorbě plazmatu

Tyto techniky zahrnují tvorbu stejnosměrného proudu, nebo elektrického výboje mezi párem elektrod s protékajícím plynem (dusík, nebo helium) vytvářejícím plazma, tedy proud ionizovaných molekul, radikálů, excitovaných neutrálních molekul a elektronů. Tato plazma je směřována na vzorek, kde dochází k desorpci a ionizaci.

3.1.5.1 DART

DART¹⁷ byl poprvé publikován v roce 2005 a spolu s DESI otevřely nové pole hmotnostní spektrometrie a to ambientní hmotnostní spektrometrii. Je jednou z nejrozšířenějších technik, navíc komerčně dostupnou. Byl aplikován na velké množství vzorků plynných, kapalných i pevných, od nepolárních až po velmi polární a na různých površích.

Mechanismus

V současné chvíli není jednoznačná interpretace komplexního procesu odehrávajícího se během DART analýzy. Je ale jasné, že unikátním prvkem pro DART je primární ionizace, probíhající jako Penningova ionizace (Rovnice (3.8)).^{17,30} Protože jsou po elektrickém výboji ionty odstraněny z proudu plynu, je analyzovaný povrch vystaven proudu horkých, ale neutrálních atomů a molekul. Neutrální atomy a molekuly N jsou excitovány v doutnavém výboji za tvorby metastabilních N*, jež předávají energii molekulám analytu M s nižším ionizačním potenciálem za tvorby M⁺ a elektronu e⁻.



Helium je nejčastěji používaným plynem a má vnitřní energii 19,8 eV, která je vyšší než ionizační energie většiny plynů v atmosféře. Může proto jednoduše ionizovat molekuly vody, které následně kaskádově reagují s neutrálními molekulami vody (podobně v chemické ionizaci) za vzniku klastrů [(H₂O)_n + H]⁺, které posléze protonizují molekuly analytu a vytváří tak [M + H]⁺.

DART tvoří [M + H]⁺ ionty hlavně z polárních analytů. Bylo ale prokázáno, že je možné tyto ionty vytvářet i s nepolárními molekulami. Příkladem je detekce nederivatizovaného *n*-alkanu a cholesterolu po přidavku malého množství fluorbenzenu do vzorku.³⁰

Instrumentace

Instrumentace DART je velice komplexní soustavou skládající se z několika komor, kterými protéká plyn rychlostí 1 l·min⁻¹. Elektrický potenciál (1-5 kV) vytváří doutnavý výboj, který produkuje ionty, elektrony a excitované neutrální molekuly. DART plazma je proto vytvářena přes APGDI. Plazma prochází přes

první elektrodu, kde dochází k odstranění iontů, k ohřívacímu tělesu, kde je nastavena teplota od pokojové až po 500 °C (teplota plazmatu se zvyšuje za účelem zvýšení termální desorpce) až ke vzorku, kde dochází k desorpci, ionizaci a následně k transportu vzniklých iontů do hmotnostního spektrometru.

Aplikace

DART byl použit například ve forenzní analýze,⁶⁸ farmacii⁶⁹ a potravinové chemii.⁷⁰ Automatický DART zdroj byl také aplikován ke kvantitativní analýze léčiv jako je verapamil, alprozolam a praparakain přímo z biologické tkáně jako jsou mozek, játra a žlučník potkana.⁷¹

3.2 Spojení tenkovrstvé chromatografie a hmotnostní spektrometrie

TLC je jednoduchý a levný způsob planární chromatografie, který je již více než 70 let široce používán v laboratořích pro separaci sloučenin. Obvykle bývají pro vizualizaci stop nanesených látek používány optické a chemické metody, které ale neumožňují přímou identifikaci a strukturní charakterizaci. Proto bylo věnováno úsilí o propojení TLC s hmotnostní spektrometrií, jedním z nejúčinnějších nástrojů analytické chemie pro strukturní analýzu.

3.2.1 Tenkovrstvá chromatografie

TLC je díky jednoduchosti, ceně a snadnému používání hojně používaná pro separaci a čištění směsí sloučenin. Protože je pro každou separaci používána nová TLC deska, je eliminován paměťový efekt, který je problémem u jiných chromatografických metod. Další výhodou je fakt, že TLC analýza probíhá za ambientních podmínek.

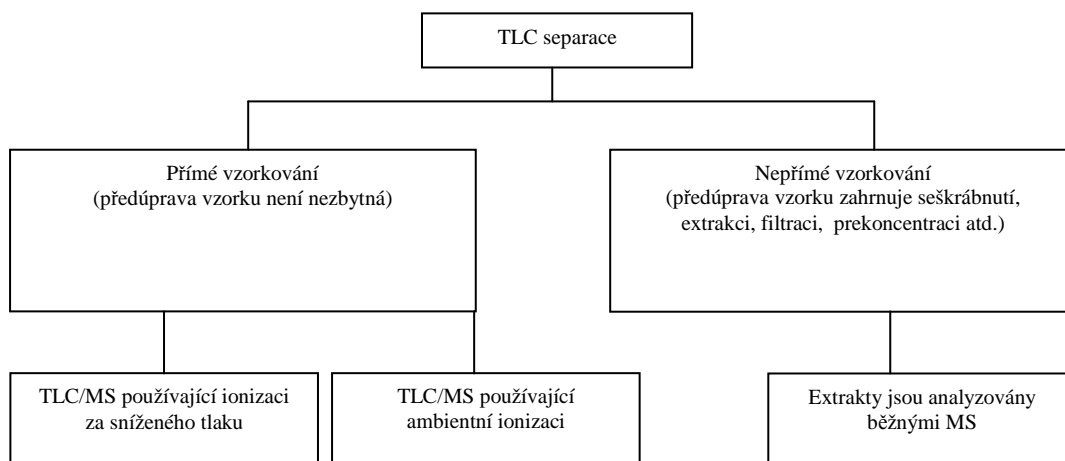
Stacionární fází je obvykle silikagel, celulóza, nebo monolitický polymer, jež jsou upevněny na kovové, plastové, nebo skleněné podložce. Mobilními fázemi jsou obvykle nejrozumnější organická rozpouštědla.

TLC je jednoduchá a rychlá chromatografická technika, ale s nízkou separační účinností. Proto bylo vyvinuto několik TLC technik zvyšujících separační faktor, rozlišení a reprodukovatelnost. HPTLC (vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie) používá zrna silikagelu s menším průměrem (4-6 μm) a užší distribucí velikostí tak, aby se zvýšil počet interakcí mezi stacionární fází a analyzovanými molekulami.⁷² UTLC (ultra tenkovrstvá chromatografie) používá velmi tenkou vrstvu stacionární fáze (10 μm) tak, aby byla snížena horizontální difúze.⁷³ OPLC (overpressured layer chromatography) používá pumpu pro řízený průchod mobilní fáze fází stacionární.⁷² ME-TLC (mikroemulzní tenkovrstvá chromatografie) používá mikroemulzi vody v oleji jako mobilní fáze.⁷³

Po vyvinutí směsi látek musí být separované analyty na TLC desce detekovány. Obvykle se detekce provádí sprejováním, nebo ponořením desky do chemického činidla, které reaguje s funkčními skupinami analyzovaných molekul, a tak je zviditelní. Jinou možností jsou optické metody, které využívají absorpčních, emisních, či fluorescenčních vlastností analytů. Chemické i optické metody ale nejsou dostatečně univerzální, protože jsou závislé na konkrétních charakteristikách analyzovaných molekul, navíc schopnost určovat chemickou strukturu je u těchto detekčních metod velmi nízká.

3.2.2 TLC/MS

Hmotnostní spektrometrie je již běžně a úspěšně používána ve spojení s jinými chromatografickými technikami jako GC a HPLC, kde eluované sloučeniny vstupují přímo do ionizačního zdroje hmotnostního spektrometru. Interface TLC s MS není tak jednoduchý jako v případě GC/MS a HPLC/MS, protože molekuly analytu nejsou eluovány mobilní fází z kolony se stacionární fází, ale zůstávají adsorbovány na TLC desce. Při propojení TLC/MS tedy musí být sloučeniny nejprve odděleny z povrchu adsorbentu a až následně vstupují do hmotnostního spektrometru. Několik TLC/MS technik bylo vyvinuto.⁷⁴ Liší se způsobem oddělení analytu z povrchu adsorbentu a také použitým ionizačním zdrojem hmotnostního spektrometru.



Obr. 3.6 Možné přístupy k TLC/MS.

3.2.2.1 Nepřímé vzorkování TLC/MS

Tyto techniky vyžadují před samotnou MS analýzou předúpravu vzorku zahrnující zjištění pozice analytu, seškrábnutí adsorbentu s analytem, extrakci, čištění extraktu, prekoncentraci atd. Detekce skvrn před seškrábnutím musí využívat nedestruktivní chemické a optické metody. Nejběžněji používanými iontovými zdroji při nepřímém vzorkování jsou EI (elektronová ionizace) a CI (chemická ionizace), kdy extrahovaný analyt vstupuje do iontového zdroje přes DIP (sonda pro přímý vstup).⁷⁵

Pokud se nepodařilo sloučeniny na TLC dostatečně oddělit, mohou být extrahované látky podrobeny další separaci na GC/MS, nebo LC/MS. Při GC/MS je často nutné derivatizovat polární sloučeniny.⁷⁶

Jinou možností jsou hmotnostní spektrometry pracující na principu desorpce/ionizace, např. LSIMS (liquid secondary ion mass spektrometry), LDI (desorpční ionizace laserem) a MALDI. Tyto techniky využívají urychlené ionty (8-10 kV), nebo laserové pulzy k nárazu na povrch extrahovaného vzorku (v přítomnosti, či nepřítomnosti matrice) a následně k desorpci a ionizaci molekul.

Ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku jako ESI, APCI a APPI mohou být rovněž použity pro nepřímé vzorkování TLC/MS.

Výhodou nepřímého TLC/MS je, že extrakt vzorku je čistý, koncentrovaný a neobsahuje částčky adsorbentu, čímž nedochází ke znečišťování hmotnostního spektrometru. Zakoncentrovaný roztok umožňuje jednodušší analýzu sloučenin

přítomných ve stopovém množství. Na druhou stranu nepřímé vzorkování je časově náročné, neposkytuje přesné chromatografické a kvantitativní informace a neznámé sloučeniny ve vzorku, jež není možné zviditelnit chemicky, ani opticky, nemůžeme do hmotnostního spektrometru vůbec převést.

Přímé vzorkování TLC/MS

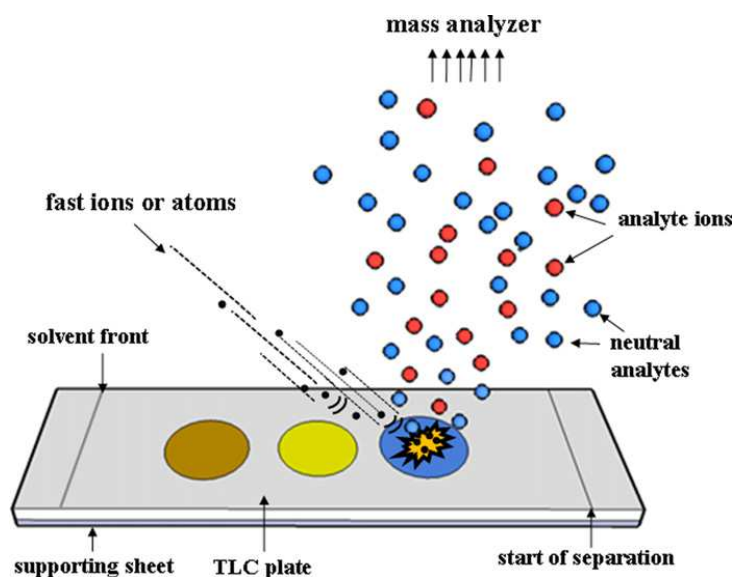
Hmotnostní spektrometry umožňující přímou analýzu povrchu, mohou být použity ve spojení s TLC, jež je planární chromatografickou technikou. Nevyžadují předúpravu vzorku. Podle použitého iontového zdroje rozdělujeme tyto techniky na ty, které využívají (a) ionizaci za sníženého tlaku a (b) ambientní ionizaci.

3.2.2.2 Přímé vzorkování TLC/MS používající ionizaci za sníženého tlaku

Metody přímého vzorkování TLC/MS používající ionizaci za sníženého tlaku jsou vhodné především pro analýzu netěkavých a termálně nestabilních sloučenin přímo z TLC desky. Pracují na principu desorpce/ionizace (DI). Jsou limitovány používáním vakua, tudíž velikost iontového zdroje omezuje velikost chromatografické desky a nejsou vhodné pro analýzu velmi těkavých sloučenin.

3.2.2.2.1 Přímé vzorkování TLC/MS používající urychlené atomy a ionty pro desorpci/ionizaci

Při FAB (fast atom bombardement) a LSIMS urychlené atomy a ionty narážejí na povrch vzorku a způsobují desorpci a ionizaci molekul. Po TLC je deska pokryta viskózním matričním roztokem (např. methanolvý roztok glycerolu, *m*-nitrobenzyl alkoholu, triethanolaminu, nebo thioglycerolu), který (a) absorbuje, rozptyluje a přenáší energii urychlených atomů, nebo iontů na analyt (b) sám „čistí“ bombardovanou oblast (c) poskytuje protony pro ionizaci (d) prodlužuje dobu trvání signálu.



Obr. 3.7 FAB a SIMS ve spojení s TLC (převzato z Cheng, S. Y.; Huang, M. Z.; Shiea, J. J. *Chromatogr. A* **2011**, 1218, 2700–2711).

Po nanesení matričního roztoku dochází k difúzi analyzovaných sloučenin, za současného snížení rozlišení. Jakmile je deska přenesena do iontového zdroje ve vakuu, methanol je okamžitě odpařen a na desce zůstane směs matrice s analyty. Proud atomů (Ar), nebo primárních iontů (Cs^+) urychlených vysokým elektrickým potenciálem (8-10 kV) naráží na povrch vzorku a způsobuje desorpci a ionizaci molekul.⁷⁷

Rozdíl mezi technikami je v tom, že proud iontů je možno lépe fokusovat než proud atomů, proto je při LSIMS vzorkovaná oblast menší a poskytuje lépe rozlišené zobrazování než FAB.

Nevýhodami FAB a LSIMS při TLC-MS je, že (a) analyty musí být polární, aby mohly být rozpuštěny a dobře promíchány s matricí (b) těkavé sloučeniny je obtížné detekovat (c) afinita ke kationtům (H^+ , Na^+ , K^+) musí být vyšší než pro matriční sloučeniny (d) sloučeniny s relativní molekulární hmotností větší než 2000 nemohou být desorbovány (e) částice adsorbentu uvolňované během nárazu urychlených atomů, či iontů mohou poškodit vakuový systém.

3.2.2.2.2 Přímé vzorkování TLC/MS používající laserové ozařování pro desorpci/ionizaci

LDI, MALDI a SALDI (surface-assisted laser desorption/ionization) využívají laserových pulsů pro desorpci a ionizaci analyzovaných molekul na TLC desce. Při LDI není na rozdíl od MALDI používána matrice. Při SALDI je suspenze uhlíkového prášku v kapalině nanesena na TLC. Tato anorganická matrice absorbuje energii UV laseru. Pro propojení TLC s SALDI byly úspěšně aplikovány i jiné anorganické matrice obsahující nano a mikročástičky kobaltu, oxidu titaničitého, nebo silikonu tvořících suspenze.⁷⁸ MALDI a SALDI umožňují analýzu s vysokým prostorovým rozlišením. TLC/MALDI-MS bylo aplikováno pro analýzu peptidů, alkaloidů, gangliosid a lipidů. TLC/SALDI-MS bylo aplikováno pro analýzu peptidů, diuretik, polymerů a porfyrinů.⁷⁹

Nevýhodami LDI, MALDI a SALDI při TLC/MS je, že (a) kvůli sníženému tlaku je zavádění vzorků do iontového zdroje časově náročné (b) malé rozměry iontového zdroje omezují velikost TLC desky, které musí být často rozdělena na menší díly (c) nízká citlivost při analýze těkavých sloučenin (d) nízká reprodukovatelnost při kvantitativní analýze (e) interference s matricí v rozsahu nízkých relativních molekulárních hmotností.

3.2.2.3 Přímé vzorkování TLC/MS používající ambientní ionizaci

Ambientní ionizace v hmotnostní spektrometrii umožňuje přímou analýzu TLC desek za ambientních podmínek, tzn. v otevřené atmosféře. Protože TLC separace probíhá za ambientních podmínek a na analyzované molekuly adsorbované na stacionární fázi je možno pohlížet jako na „pevné“, je její propojení s ambientní ionizací mnohem jednodušší než s iontovými zdroji pracujícími za sníženého tlaku. Rozměry vakuového zdroje navíc neomezují velikost TLC desky. Mohou být analyzovány těkavé i netěkavé sloučeniny.

3.2.2.3.1 Ambientní TLC/MS odvozené od ionizace elektrosprejem používající extrakci kapalinou pro vzorkování

Pro on-line extrakci analytu z TLC desky byla vyvinuta dvě experimentální uspořádání (a) koaxiální válcovitá vzorkovací sonda (b) dvě paralelní kapiláry.

Při koaxiální válcovité vzorkovací sondě je sonda sestávající z vnitřní a vnější kapiláry přiložena kolmo k TLC desce.⁸⁰ Extrakční kapalina je pumpována skrze jehlu a dávkována na povrch TLC desky prostorem mezi vnitřní a vnější kapilárou vzorkovací sondy. Extrakční kapalina poté vnitřní kapilárou pokračuje již s rozpuštěným analytem do elektrospreje.

Jiným experimentálním uspořádáním jsou dvě paralelní kapiláry.⁸¹ První kapilárou je na TLC desku přiváděna extrakční kapalina a druhou kapilárou je extrakční kapalina s rozpuštěným analytem unášena přes filtr do elektrospreje. Tok kapaliny je zajišťovaným pumpováním komerčním LC systémem. Toto experimentální uspořádání bylo propojeno i s ICP, pro analýzu anorganických sloučenin na TLC desce.

3.2.2.3.2 Ambientní TLC/MS odvozené od ionizace elektrosprejem používající kontinuální eluci

V těchto technikách jsou analyty kontinuálně eluovány mobilní fází do elektrospreje. Používají se dvě experimentální uspořádání

V prvním případě jsou na Teflonovém podkladu vytvořeny kanálky naplněné silikagelovou stacionární fází.⁸² Jeden konec kanálku je zakončen rezervoárem s mobilní fází, na druhém konci jsou do silikagelu vložena dvě svázaná optická vlákna a jiný rezervoár s „make-up“ roztokem je s těmito vlákny propojen. Vysoké napětí na konci optických vláken nutné pro vytvoření elektrospreje je aplikováno do „make-up“ roztoku platinovým drátkem. Analyty jsou mobilní fází unášeny až na špičku optických vláken, kde dochází k ionizaci ESI mechanismem.

Ve druhém případě je silikagelová stacionární fáze nanášena na hliníkovém proužku s ostrým koncem.⁸³ Vysoké napětí pro vytvoření elektrospreje je aplikováno přes platinový drátek vložený do rezervoáru s mobilní fází.

3.2.2.3.3 Ambientní TLC-MS používající laserové ozáření a post-ionizaci elektrosprejem

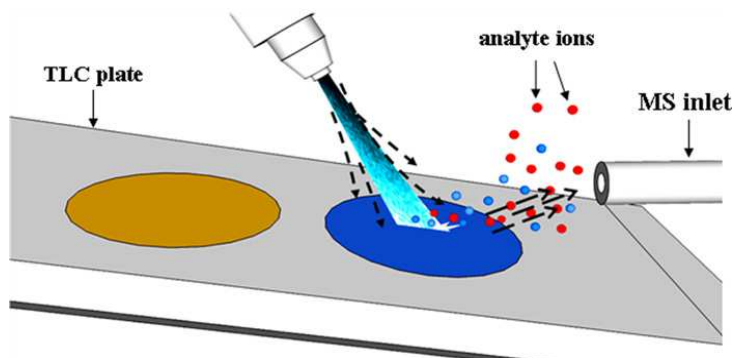
Do této kategorie patří především ambientní ionizační technika ELDI (electrospray-assisted laser desorption ionization). Analyty jsou po TLC separaci z desky desorbovány laserovým pulsem a ihned vstupují do elektrospreje umístěného horizontálně nad TLC deskou, kde dochází k ionizaci buď fúzí analytu s jemnými nabitými kapičkami rozpouštědla a následným ESI mechanismem, anebo ion-molekulárními reakcemi s protony, protonovanými ionty rozpouštědla, klastrovými ionty apod.

Nejčastěji používanými jsou UV a IR lasery, jejichž energie je dostatečná k desorpci molekul z TLC desky. Na rozdíl od MALDI a FAB není nutné používat přídatnou matrici. TLC/ELDI-MS bylo použito pro analýzu barviv, aminů a extraktů z lékových tablet.⁸⁴

3.2.2.3.4 Ambientní TLC/MS používající nabitě a neutrální kapičky pro desorpci/ionizaci

Nabitě kapičky používá DESI. TLC/DESI-MS bylo použito pro analýzu peptidů, barviv a lipidů.⁸⁵ Dvourozměrná TLC deska byla analyzována metodou DESI-MS s využitím motorizované platformy pro pohyb v osách x,y.⁸⁶

Neutrální kapičky používá ambientní ionizační technika EASI (easy ambient sonic-spray ionization). Experimentální uspořádání je shodné jako při DESI s tím rozdílem, že při EASI není aplikováno vysoké napětí. TLC/EASI-MS bylo použito pro analýzu léčiv.⁸⁷



Obr. 3.8 Schéma TLC/DESI-MS (převzato z Cheng, S. Y.; Huang, M. Z.; Shiea, J. J. *Chromatogr. A* **2011**, 1218, 2700–2711).

3.2.2.3.5 Ambientní TLC/MS odvozené od chemické ionizace za atmosférického tlaku a fotoionizace za atmosférického tlaku

APCI-MS a APPI-MS jsou účinné metody pro analýzu malých molekul od nepolárních (APPI-MS) až po velmi polární (APCI-MS).⁸⁸ TLC/APCI-MS můžeme rozdělit na (a) ambientní TLC/MS odvozené od APCI používající kontinuální eluci; (b) ambientní TLC/MS používající laserové ozáření a APCI post-ionizaci; (c) ambientní TLC/MS odvozené od APCI používající pro DI ionty a metastabilní atomy He.

3.2.2.3 Přímé vzorkování TLC/MS používající AP-MALDI

AP-MALDI se od MALDI liší pouze tím, že nepracuje za sníženého tlaku. Důsledkem toho je, že vhodné i pro analýzu těkavých sloučenin. Navíc je měkčí ionizační technikou než MALDI, protože ionty generované při AP-MALDI jsou termálně stabilnější díky „chlazení“ srážkami s molekulami vzduchu v otevřené atmosféře. AP-MALDI poskytuje vysoké prostorové rozlišení umožňující získání kvalitních chromatografických informací a molekulárních obrázků analytů po 1D, či 2D TLC separaci.

3.3 Zobrazovací hmotnostní spektrometrie za ambientních podmínek

MSI je proces, při kterém jsou získávány chemické i prostorové informace za účelem vizualizace a chemického zobrazování.⁸⁹ Chemické zobrazování (v případě kvantitativní analýzy chemické mapování) je analytický nástroj umožňující vytvářet obrazy distribuce složek ze simultánního měření spektra, prostorové a časové informace. V MSI je chemická identita molekul zkoumána jako funkce prostorové distribuce. Získány obrazy mohou být dvou i trojrozměrné. Ambientní ionizační techniky umožňují aplikovat MSI v otevřené atmosféře.

Proces MSI se skládá ze tří částí (a) přípravy vzorku; (b) získávání dat; (c) analýzy dat. Příprava vzorků je v případě ambientní ionizace často eliminována. Není nutno umisťovat vzorek do prostředí o sníženém tlaku, ani přidávat chemická činidla.

Získávání dat zahrnuje desorpci, ionizaci, hmotnostní analýzu a detekci. Získávání informace ze vzorku začíná dvěma možnými způsoby. V prvním tzv. „microprobe“ módu je celý povrch vzorku cíleně rozdělen do malých oblastí (pixelů) a tyto oblasti jsou individuálně skenovány sekvenčně v čase. Data z jednoho pixelu jsou obvykle reprezentovány jedním hmotnostním spektrem, nebo průměrem z více hmotnostních spekter získaných v rámci daného pixelu. Druhým způsobem je tzv. „microscope“ mód, kde použití astigmatické projekce iontů generovaných na povrchu na dvojdimenzionální detektor umožňuje simultánní zobrazování větších oblastí. Tento přístup významně zvyšuje rychlost analýzy, ale klade vysoké požadavky na iontovou optiku a v současné době není použitelný pro ambientní ionizační techniky.

Posledním krokem je analýza dat vedoucí k MS obrazům zahrnující zpracování signálu z detektoru a jeho zobrazení na počítači. Získaná hmotnostní spektra jsou převedena do 2D obrázkového formátu, která mohou být otevřena v software jako BioMap, Image J a FlexImaging. Chemické obrazy se zobrazují pomocí různých odstínů barev. Intenzita barvy reprezentuje intenzitu pro konkrétní poměr m/z . Chemické obrazy následně poskytují i biologické a bioinformatické parametry, například hodnotu hlavní komponenty odvozenou z vícerozměrné statistické analýzy.

3.4 Lipidy

Lipidy patří mezi přírodní látky a jsou to deriváty mastných kyselin a alifatických nebo alicyklických hydroxy- nebo aminosloučenin.^{9,90} Jejich společným znakem je hydrofobnost způsobená přítomností uhlovodíkových zbytků v molekule a projevující se mimo jiné sníženou rozpustností lipidů ve vodě. Lipidy jsou ve všech buňkách a jsou jak zásobárnou energie, tak i stavebními látkami buněčných membrán.

Dělíme je na základě struktury na lipidy jednoduché, které po hydrolýze poskytují maximálně dva primární produkty na 1 mol původního lipidu, a na lipidy složené, které po hydrolýze poskytují více než dva primární produkty na 1 mol původního lipidu.

Mezi jednoduché lipidy řadíme acylglyceroly, neboli estery glycerolu a mastných kyselin. Pevné acylglyceroly nazýváme tuky a kapalné oleje. Tuky i oleje

mohou být živočišného i rostlinného původu. Další skupinou jednoduchých lipidů jsou vosky, neboli estery vyšších alkoholů a mastných kyselin. Jejich příkladem je včelí vosk.

Mezi biologicky významnou skupinu složených lipidů patří fosfolipidy, které ve své struktuře obsahují esterově vázanou kyselinu fosforečnou. Příkladem jsou lecitiny, obsažené ve tkáních a orgánech. Jinou důležitou skupinou složených lipidů jsou glykolipidy, které ve struktuře obsahují sacharidové zbytky. Vyskytují se například v šedé kůře mozkové.

3.4.1 Novorozenecký mázek – vernix caseosa

VC je bílý krémovitý film proteinové a lipidové povahy, kterým je plod obalen během posledních tří měsíců těhotenství a kterým je novorozeně pokryto i po narození.¹⁰ Vyskytuje se pouze u lidí. VC plní funkci dočasné ochrany pokožky ve vodném prostředí *in utero*, chrání plod před bakteriální infekcí a usnadňuje tvorbu kůže. Během porodu slouží jako lubrikant. Během prvních hodin po narození zabraňuje ztrátě vody, reguluje teplotu a podporuje přirozenou imunitu. Je to materiál unikátních vlastností, jehož výzkum je důležitý zejména pro lékařství, péči o předčasně narozené děti s nevyvinutou pokožkou a pro pacienty s popáleninami. VC vykazuje potenciál antibakteriální, antioxidační látky zároveň usnadňující regeneraci pokožky po zranění.

VC je komplexní materiál obsahující asi 80 % vody, 10 % proteinů a 10 % lipidů. Lipidová frakce není dosud přesně charakterizována. Mezi v současné době identifikovanými lipidy převládají voskové estery a triacylglyceroly. Znalosti o přítomnosti polárních lipidů, majících například antibakteriální funkci, jsou zatím malé.

4. Experimentální část

4.1 Použité chemikálie

Aceton	≥ 99,8 % Chromasolv [®] pro HPLC, gradient grade, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Acetonitril	≥ 99,8 % Chromasolv [®] pro HPLC, gradient grade, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Amonná sůl kyseliny fosfatidové	Phosphoglycerides kit Cat. No. 1052, Matreya LLC (Pleasant Gap, USA)
Behenyl behenát	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Cerebrosid	Phosphoglycerides kit Cat. No. 1052, Matreya LLC (Pleasant Gap, USA)
Cerebrosid sulfát	Phosphoglycerides kit Cat. No. 1052, Matreya LLC (Pleasant Gap, USA)
Cholesteryl stearát	≥ 99 %, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Deionizovaná voda	Milli Q, Millipore (Milford, MA, USA)
1,2-Dikaprin	99 %, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
1,3-Dikaprin	Larodan AB (Malmö, Švédsko)
Diethylether	p.a., destilovaný, Penta (Chrudim, ČR)
Fosfatidylethanolamin	Phosphoglycerides kit Cat. No. 1052, Matreya LLC (Pleasant Gap, USA)
<i>lyso</i> -Fosfatidylcholin	Phosphoglycerides kit Cat. No. 1052, Matreya LLC (Pleasant Gap, USA)
Fosfatidylserin	Phosphoglycerides kit Cat. No. 1052, Matreya LLC (Pleasant Gap, USA)
Hexan	≥ 97,0 % Chromasolv [®] pro HPLC, gradient grade, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Chloroform	p.a., stabilizovaný 1 % ethylalkoholu, Penta (Chrudim, ČR)
Kofein	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Kyselina mravenčí	p.a., 85 %, Penta (Chrudim, ČR)
Kyselina octová	99 %, Lach-Ner (Neratovice, ČR)
Kyselina palmitová	> 99,5 %, Fluka Chemie AG (Buchs, Švýcarsko)
Methanol	LC-MS Chromasolv [®] , Fluka Chemie AG (Buchs, Švýcarsko)
1-Monokaprin	Larodan AB (Malmö, Švédsko)
Octan amonný	> 99 %, Fluka Chemie AG (Buchs, Švýcarsko)
Palmityl oleát	99 %, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Propan-2-ol	LC-MS Chromasolv [®] , Fluka Chemie AG (Buchs, Švýcarsko)
Rhodamin B	fix Sharpie [®] twin tip, Sanford corporatin (Oak Brook, USA)
Sfingomyelin	Phosphoglycerides kit Cat. No. 1052, Matreya LLC (Pleasant Gap, USA)
<i>cis</i> -9-Trikosen	97 %, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Trilinolein	> 99 %, Nu-Chek Prep (Elysian, USA)
Trilinolenin	> 99 %, Nu-Chek Prep (Elysian, USA)
Triolein	> 99 %, Nu-Chek Prep (Elysian, USA)
Verapamil	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

4.2 Použitý materiál

HPTLC deska	Nano Silica XHL HPTLC plates, w/UV 254, glass backed, 10x10 cm, 200 µm, Cat. No. 4214156, Sorbent Technologies, Inc. (Atlanta, USA)
Nerezová deska	nerezová MALDI deska pro nanesení vzorků, AB SCIEX (Framingham, USA)
Plexisklo	Plexiglas Satinice clear 0F00 DC, Zenit spol. s.r.o. (Praha, ČR)

Skleněná deska	Microscope slides, Waldemar Knittel Glasbearbeitungs-GmbH (Braunschweig, Německo)
TLC deska	Silica gel matrix on TLC aluminum foils, 10x20 cm, 200 µm, Cat. No. 02599, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Teflonová deska	PTFE plate, material type: standard PTFE, Fluoro-Plastics, Inc. (Philadelphia, USA)
Teflonová fólie	PTFE film, thickness: 0,25 mm, Vink Finland (Kerava, Finsko)

4.2.1 Povrchy pro DESI/DAPPI

- skleněná deska
- Teflonová deska
- Teflonová folie
- plexisklo
- nerezová deska
- TLC deska
- HPTLC deska

4.3 Přístroje a zařízení

4.3.1 LCQ Fleet

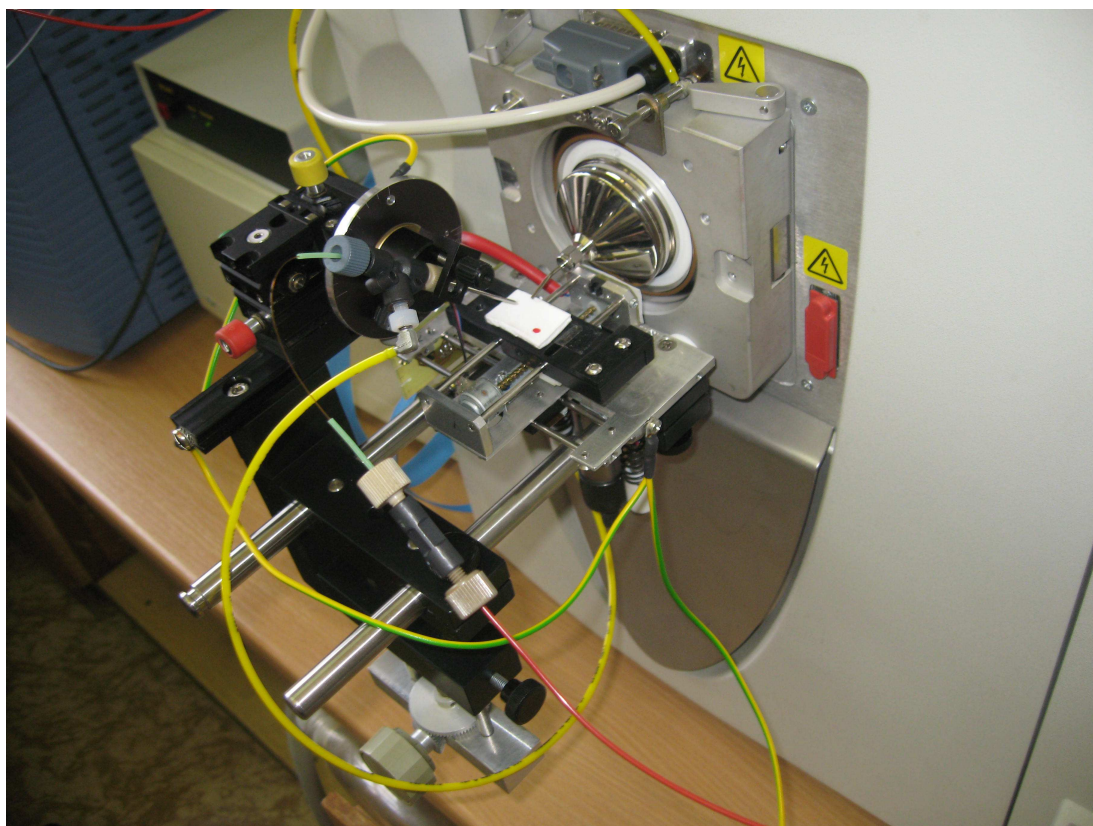
LCQ Fleet (Thermo Fisher Scientific) je hmotnostní spektrometr s 3D iontovou pastí schopný víceúrovňové (MS^n) CID a s hmotnostním rozsahem m/z 50 - 2000 u. Počítačové ovládání přístroje, řízení analýzy, úprava experimentálních podmínek, prohlížení a zpracování spekter bylo prováděno v programu Xcalibur (Thermo Fischer Scientific).

4.3.2 DESI/DAPPI zdroj pro ambientní ionizaci

V laboratoři byl zkonstruován DESI/DAPPI zdroj pro ambientní ionizaci,⁹¹ který je plně kompatibilní s hmotnostním spektrometrem LCQ Fleet a může být připojen stejným způsobem jako zdroje pro ionizaci za atmosférického tlaku ESI a APCI. Zdroj pro ambientní ionizaci umožňuje libovolné prostorové uspořádání sprejeru a platformy pro umístění vzorku pomocí soustavy mikrometrických šroubů a polohovadel.

4.3.2.1 DESI

DESI sprejer sestává z kovové jehly a plastové T-spojky, jež je připojena k přívodu zmlžovacího plynu a také ke křemenné kapiláře (vnější průměr: 400 μm vnitřní průměr: 100 μm) se sprejovací kapalinou. Na kovovou jehlu je přivedeno vysoké napětí.



Obr. 4.1 Fotografie používané DESI aparatury.

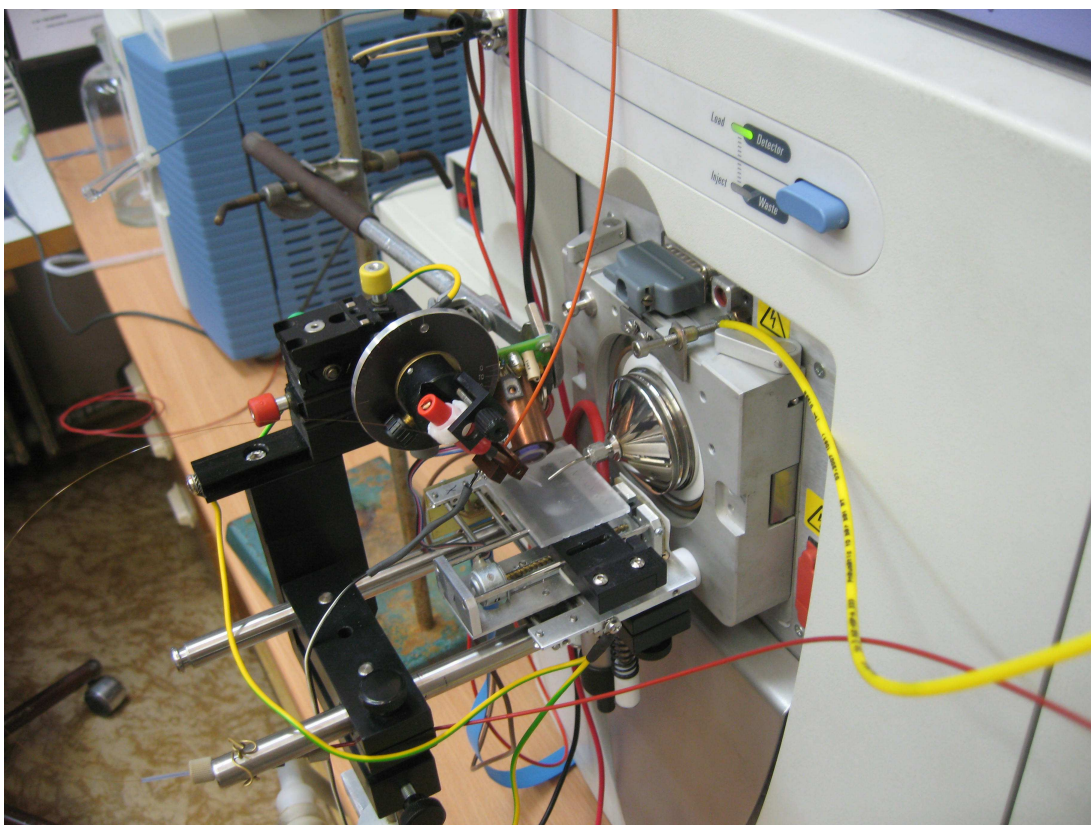
4.3.2.2 DAPPI

DAPPI mikročip byl vyroben ve Finsku v laboratoři prof. R. Kostianena a skládá se ze dvou spojených skleněných destiček.⁹² Přívod rozpouštědla, vstup pro plyn, odpařovací drážka a tryska jsou na vrchní destičce. Platinové topné těleso je začleněno na spodní destičce. Rozpouštědlo vstupující do mikročipu křemennou kapilárou je míseno se zmlžovacím plynem v odpařovací drážce. Tryska vytváří úzký proud par rozpouštědla a zmlžovacího plynu.

Mikročip je externě elektricky ohříván zařízením ISO-TECH programmable power supply IPS-603, ISO-TECH (Northamptonshire, Velká Británie).

UV lampa PKR 106, 58 mm x 12,7 mm, Heraeus Noblelight (Hanau, Německo) pro fotoionizaci je nízkotlaká výbojka plněná kryptonem emitující fotony o energii 10 eV (malá část má energii 10,6 eV).

Elektrody UV lampy jsou připojeny na zdroj střídavého proudu, AUL 210 (ZPA Košáře, ČR).



Obr. 4.2 Fotografie používané DAPPI aparatury.

4.3.3 Softwarově ovládaná motorizovaná platforma

V laboratoři byla zkonstruována softwarově ovládaná platforma s krokovými motory. Program XCalibur Scanner control (Vladimír Příbyl, ÚOCHB AV ČR) umožňoval přesné zadání dráhy a rychlosti pohybu platformy v linii, či v ploše. Výsledkem byla možnost definované analýzy podél linie, i definované analýzy plochy.

4.3.4 Ostatní přístroje

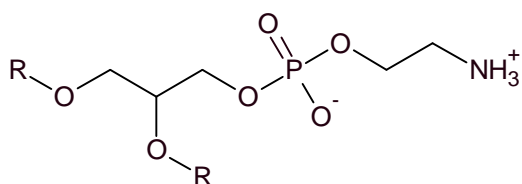
Analytické váhy Mettler AE 240 (Greifensee, Švýcarsko)

Čerpadlo Harvard apparatus 11 plus (Holliston, USA)

4.4 Seznam analyzovaných látek a objektů

4.4.1 Lipidy

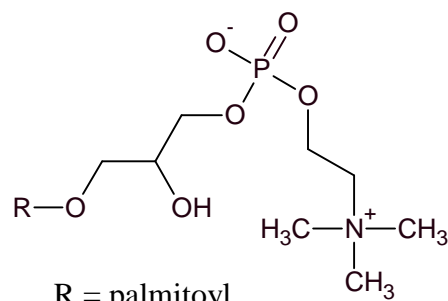
4.4.1.1 Fosfolipidy



R = oleoyl

monoizotopická hmotnost = 743,55 u

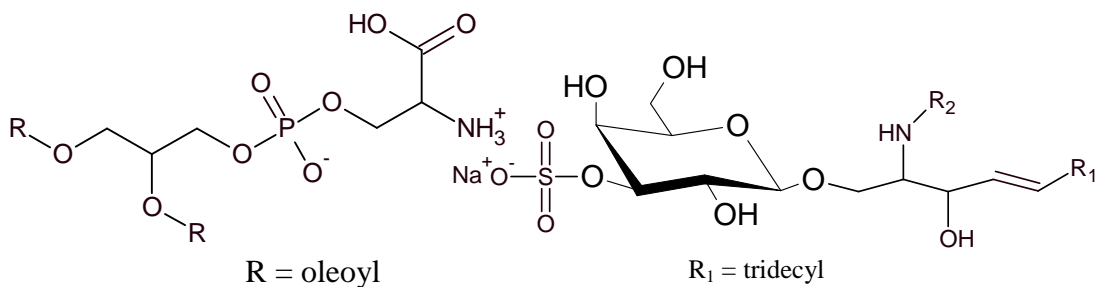
Obr. 4.3 Fosfatidylethanolamin (PE).



R = palmitoyl

monoizotopická hmotnost = 495,33 u

Obr. 4.4 *lyso*-Fosfatidylcholin (*lyso*-PC).



R = oleoyl

monoizotopická hmotnost = 787,54 u

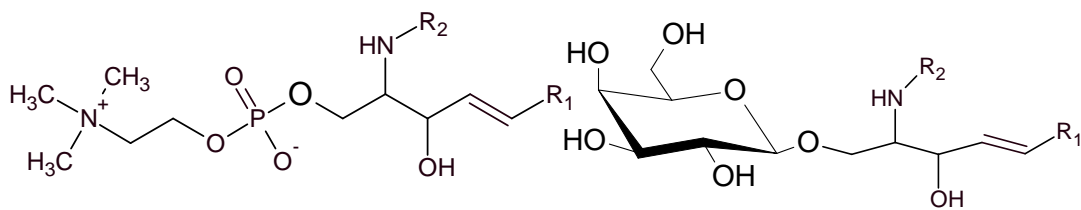
Obr. 4.5 Fosfatidylserin (PS).

R₁ = tridecyl

R₂ = stearoyl

monoizotopická hmotnost = 829,53 u

Obr. 4.6 Cerebrosid sulfát (ST).



R_1 = tridecyl R_2 = stearoyl

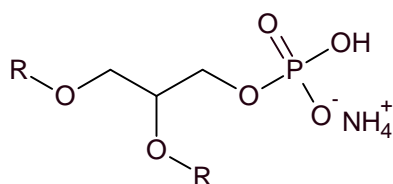
monoizotopická hmotnost = 730,60 u

Obr. 4.7 Sfingomyelin (SM).

R_1 = tridecyl R_2 = lignoceroyl

monoizotopická hmotnost = 811,69 u

Obr. 4.8 Cerebrosid (CER).

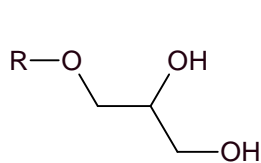


R = oleoyl

monoizotopická hmotnost = 717,53 u

Obr. 4.9 Amonná sůl kyseliny fosfatidové (PA).

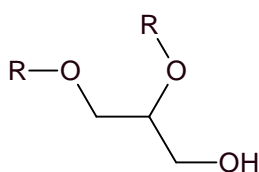
4.4.1.2 Acylglyceroly



R = kaprinoyl

monoizotopická hmotnost = 246,18 u

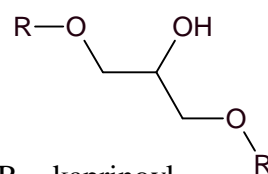
Obr. 4.10 1-Monokaprin.



R = kaprinoyl

monoizotopická hmotnost = 400,32 u

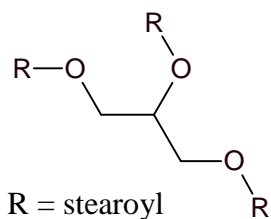
Obr. 4.11 1,2-Dikaprin.



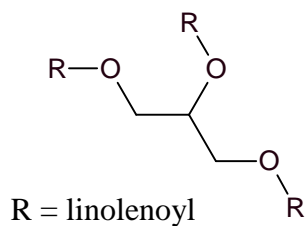
R = kaprinoyl

monoizotopická hmotnost = 400,32 u

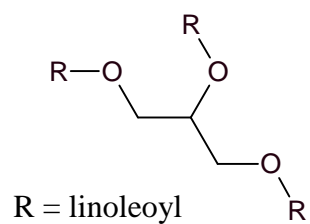
Obr. 4.12 1,3-Dikaprin.



monoizotopická hmotnost = 890,83 u



monoizotopická hmotnost = 872,69 u

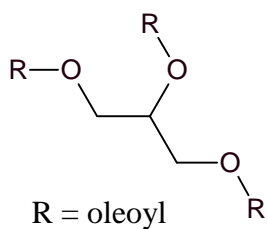


monoizotopická hmotnost = 878,74 u

Obr. 4.13 Tristearin.

Obr. 4.14 Trilinolenin.

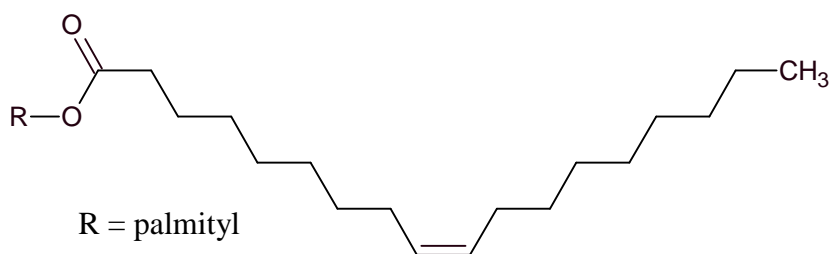
Obr. 4.15 Trilinolein.



monoizotopická hmotnost = 884,78 u

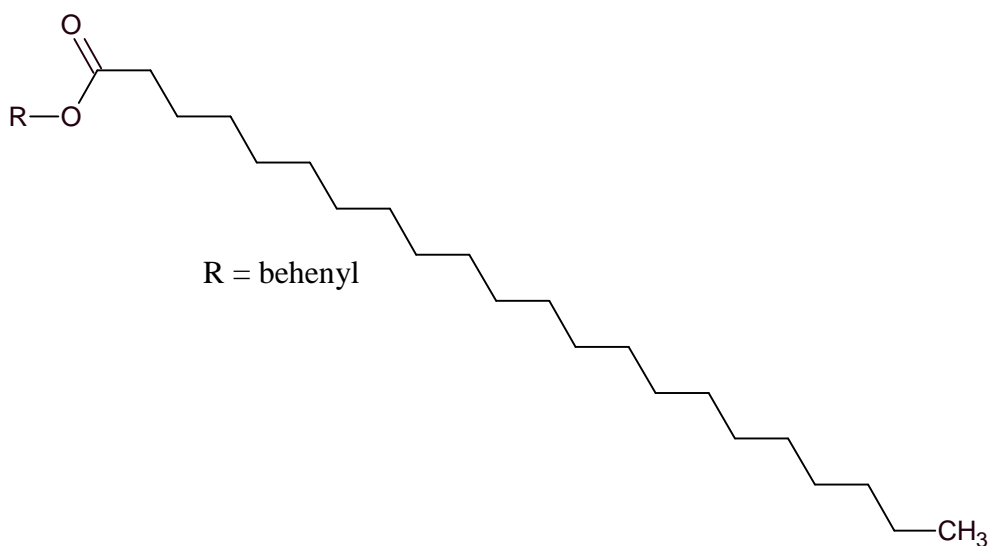
Obr. 4.16 Triolein.

4.4.1.3 Voskové estery



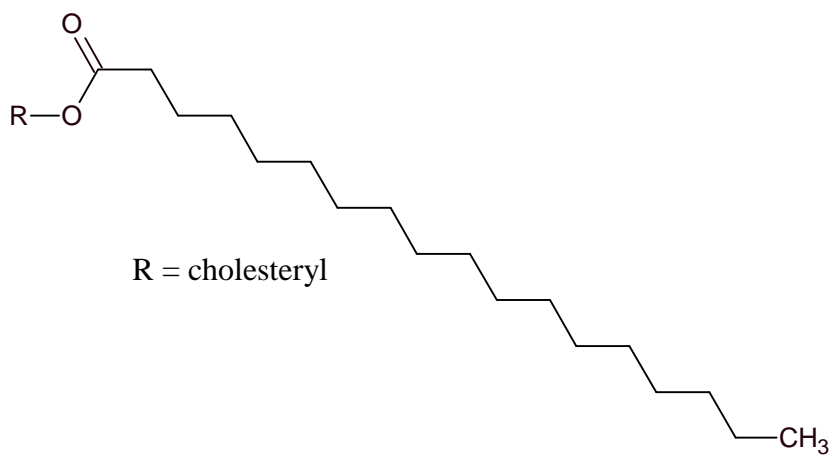
monoizotopická hmotnost = 506,51 u

Obr. 4.17 Palmityl oleát.



monoizotopická hmotnost = 648,68 u

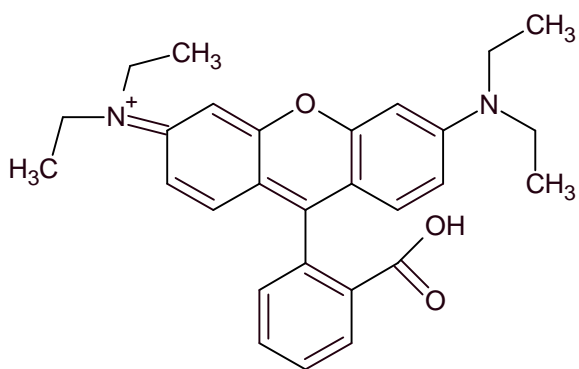
Obr. 4.18 Behenyl behenát.



monoizotopická hmotnost = 652,62 u

Obr. 4.19 Cholesteryl stearát.

4.4.2 Ostatní



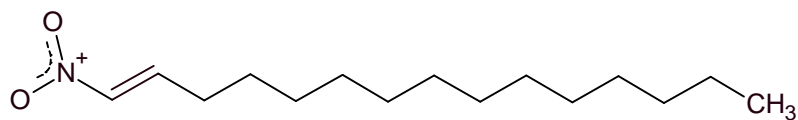
monoizotopická hmotnost = 443,23 u

Obr. 4.20 Rhodamin B.



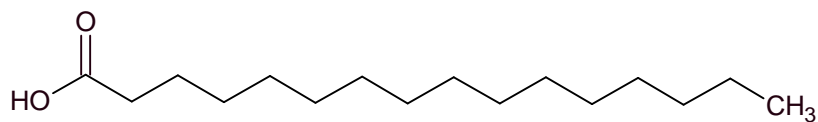
monoizotopická hmotnost = 194,08 u

Obr. 4.21 Kofein.



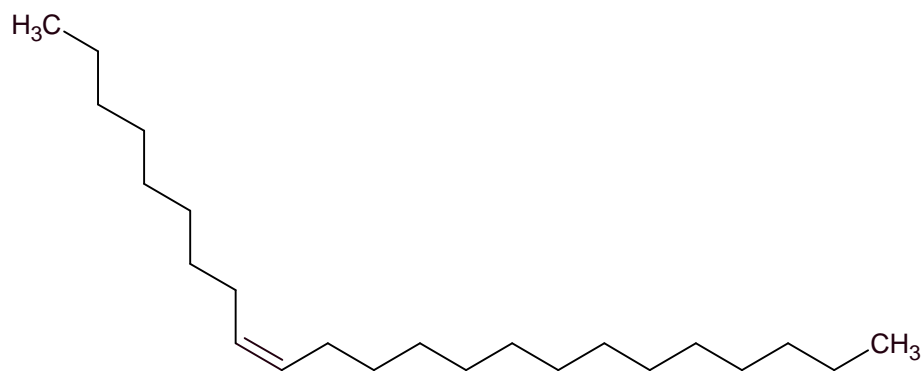
monoizotopická hmotnost = 255,40 u

Obr. 4.22 *trans*-1-Nitropentadec-1-en.



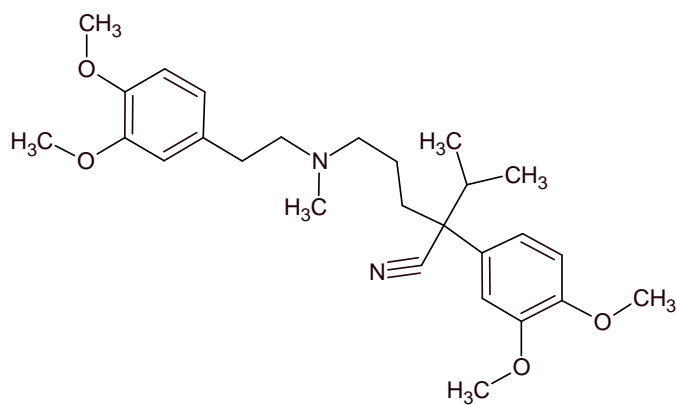
monoizotopická hmotnost = 256,24 u

Obr. 4.23 Kyselina palmitová.



monoizotopická hmotnost = 322,36 u

Obr. 4.24 *cis*-9-Triksen.



monoizotopická hmotnost = 454,28 u

Obr. 4.25 Verapamil.

4.5 Experimentální podmínky, metodika měření a zpracování výsledků

4.5.1 Neměnné/fixní experimentální podmínky

Jsou to experimentální parametry, které byly shodné pro všechny DESI analýzy a všechny DAPPI analýzy.

DESI

- sprejovací napětí
- teplota kapiláry
- průtok zmlžovacího plynu
- napětí na vstupní kapiláře
- nastavení ostatních komponent přístroje, jako jsou iontová optika, vakuový zdroj apod.

DAPPI

- příkon externího ohřívání mikročipu
- teplota kapiláry
- průtok zmlžovacího plynu
- napětí na vstupní kapiláře
- nastavení ostatních komponent přístroje, jako jsou iontová optika, vakuový zdroj apod.

4.5.2 Měnné/se/variabilní experimentální podmínky

Jsou to experimentální parametry, které byly při DESI i DAPPI analýzách nastaveny různě.

DESI/DAPPI

- ionizace v pozitivním/negativním módu
- geometrie/prostorové uspořádání

- sprejovací kapalina
- průtok sprejovací kapaliny
- typ povrchu a rychlost jeho pohybu
- objem a koncentrace vzorku

4.5.3 Hmotnostně-spektrometrická analýza z jednoho bodu, podél linie a plochy

Při analýze z jednoho bodu byl sprejer namířen po dobu 12, 30, nebo 60 s na jedno místo zkoumaného povrchu, který se nepohyboval.

Při analýze podél linie byl sprejer namířen na počátek imaginární linie nastavené v programu XCalibur Scanner control na zkoumaném povrchu, jenž se následně pohyboval po přednastavené úsečce.

Při analýze plochy je sprejer namířen na pravý horní roh imaginárního pravoúhlého čtyřúhelníku nastaveného v programu XCalibur Scanner control na zkoumaném povrchu, jenž se následně pohybuje po přednastavené ploše.

4.5.3.1 Postup práce

1) Editace metody/nastavení experimentálních podmínek

Při editaci metody se nastavovaly experimentální podmínky. Neměnné/fixní experimentální podmínky, tzn. ty, které byly stejné zvlášť v rámci všech DESI a DAPPI analýz, ukazují Tab. 4.1 a Tab. 4.2.

Tab. 4.1 Neměnné/fixní experimentální parametry DESI.

DESI:

experimentální parametr	hodnota
sprejovací napětí	3,5 kV
teplota kapiláry	200 °C
průtok zamlžovacího plynu	70 AU
napětí na vstupní kapiláře	10 V

Tab. 4.2 Neměnné/fixní experimentální parametry DAPPI.

DAPPI:

experimentální parametr	hodnota
-------------------------	---------

příkon externího ohřívání mikročipu	4,5 W
teplota kapiláry	220 °C
průtok zmlžovacího plynu	10 AU = 180 ml·min ⁻¹
napětí na vstupní kapiláře	5 V

2) Optimalizace geometrie/prostorového uspořádání před měřením

Prostorové uspořádání zahrnuje vzájemnou polohu mezi sprejerem, zkoumaným povrchem a vstupem do hmotnostního spektrometru. Klíčovou úlohu tedy hrají vzdálenosti a úhly mezi těmito komponentami. Protože sprejer je nutno před každým měřením znovu instalovat, byla před každým měřením optimalizována geometrie, tzn. upraveny vzdálenosti a úhly tak, aby byla sledovaná intenzita signálu co nejvyšší. DESI se optimalizovalo na rhodaminu B a optimální intenzita signálu byla asi $1 \cdot 10^4$ AU. DAPPI se optimalizovalo na verapamilu a optimální intenzita signálu byla asi $1 \cdot 10^5$ AU.

3) Nanesení vzorku na povrch

Většina studovaných látek se nanášela automatickou pipetou ve formě roztoku. Pro kvalitativní analýzu byly o koncentracích 1,00 a 100 mg·ml⁻¹, pro semi-kvantitativní analýzu (určování mezí detekce a stanovitelnosti) byly o koncentracích 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 50,0; 100,0; 200,0; 300,0; 500,0; 1000,0; 2000,0 a 5000,0 µg·ml⁻¹. Výjimkami byli rhodamin B, který byl nanášen fixem Sharpie® twin tip, Sanford corporatin (Oak Brook, USA), černý inkoust pro analýzu plochy, který byl nanášen fixem edding 140 S, edding International GmbH (Ahrensburg, Německo), surový vernix, který byl rozestírán špachtlí a termiti rodu *Prorhinotermes* (Isoptera, Rhinotermitidae), kteří byly usmrceni ochlazením na -18 °C po dobu 30 minut a k povrchu byly následně upevněny korekční tekutinou Kores Aqua, Kores (Viedeň, Rakousko).

Při práci s novorozeneckým mázkem se manipulovalo jednak se surovou formou, ale také se dvěma celkovými lipidovými extrakty. První (tzv. Folch⁹³) byl získán extrakcí mázku směsí rozpouštědel CH₃OH/CHCl₃. Druhý (tzv. MTBE⁹³) byl získán extrakcí methyl-*t*-butyl etherem. Oba celkové lipidové extrakty byly připraveny Mgr. Radkou Míkovou.

4) A. Softwarové nastavení časového intervalu sběru dat a umístění povrchu se vzorkem do správné pozice (analýza z jednoho bodu)

Povrch se vzorkem byl buď ručně, nebo pohybem motorizované softwarově ovládané platformy umístěn do správné polohy, tzn. tak, aby směs emitovaná sprejerem účinně dopadala na analyzovanou sloučeninu. Zároveň je v programu nastaven časový interval, po který dochází ke sběru dat.

B. Softwarové nastavení analyzované linie, rychlosti pohybu motorizované platformy a umístění povrchu se vzorkem do správné pozice (analýza podél linie)

Program XCalibur Scanner control umožňoval pomocí přehledného vizuálního rozhraní nastavit linii, podél které bude analýza probíhat, a rovněž umožňoval nastavit rychlost pohybu motorizované platformy. Příkazem se povrch se vzorkem automaticky přemístil do pozice na počátek zvolené analyzované linie.

C. Softwarové nastavení analyzované plochy, časového intervalu sběru dat z jedné pozice, délky „kroku“ mezi analyzovanými pozicemi a umístění povrchu se vzorkem do správné pozice (analýza plochy)

Program XCalibur Scanner control umožňoval pomocí přehledného vizuálního rozhraní nastavit plochu, ve které bude analýza probíhat. Rovněž umožňoval nastavit časový interval sběru dat z jedné pozice a délku „kroku“ mezi analyzovanými pozicemi. Příkazem se povrch se vzorkem automaticky přemístil do pozice na pravý horní roh zvolené analyzované plochy vymezené pravoúhlým čtyřúhelníkem.

5) Spuštění analýzy a sběr dat

Příkazem v programu se spustí analýza.

6) A. Prohlížení a úprava dat v programu Xcalibur (analýza z jednoho bodu, analýza podél linie)

Získaná data z analýzy z jednoho bodu a z analýzy podél linie je možno prohlížet a upravovat v programu Xcalibur.

B. Konverze dat a jejich prohlížení a úprava ve vhodném programu (analýza plochy)

Výsledkem analýzy plochy byl soubor mnoha dat, která byla následně konvertována programem imzML 2D builder for BioMap (Vladimír Příbyl, ÚOCHB AV ČR) do jednoho souboru, jenž byl otevřen ve vhodném prohlížeči, jakým byl BioMap (Novartis).

4.5.4 Zpracování a zobrazování výsledků

Naměřená data byla zpracována a zobrazena ve dvou formách:

- závislost intenzity signálu na poměru m/z (hmotnostní spektrum)
- závislost intenzity signálu zvoleného rozsahu m/z na vzdálenosti od počátečního bodu analýzy

4.5.5 Tenkovrstvá chromatografie

Sledované analyty byly nanášeny 5 mm od spodního okraje chromatografické desky pomocí automatické pipety s výměnnou špičkou zakončenou skleněnou kapilárou. Vyvíjeny byly v uzavřených skleněných chromatografických komorách. Po vyvinutí byly desky vysušeny v proudu dusíku.

Nespecifická detekce byla provedena postříkáním desky zředěnou kyselinou sírovou a následným zahřátím horkovzdušnou pistolí. MS detekce byla provedena metodou DESI-MS, nebo DAPPI-MS.

4.5.6 Určení meze detekce a meze stanovitelnosti

Nejprve byla pro DESI i DAPPI vypočítána směrodatná odchylka z průměrných hodnot intenzit signálu zvoleného rozsahu m/z získaných ze souboru 10 měření blanku (tzn. čistých povrchů bez analytu) probíhajících 30 s na Teflonové desce a plexiskle. Měření blanku probíhalo způsobem analýzy z jednoho bodu.

Pro každý analyt a ambientní ionizační techniku na Teflonové desce a plexiskle byly změřeny tři signály z různých míst odpovídající třem různým absolutním množství stanoveného analytu. Jedno měření analytu probíhalo po dobu 12 s a to způsobem analýzy z jednoho bodu. Intenzity signálu pro konkrétní množství analytu byly získány výpočtem průměrné intenzity signálu pro zvolený

rozsah m/z , jež závisí na stanovovaném analytu, v časovém intervalu 0,07-0,11 min (časový interval, kdy byla intenzita signálu nejvyšší). Tento časový interval byl použit pro všechna stanovení. Následně byla třemi zjištěnými body proložena kalibrační křivka získaná metodou lineární regrese. Absolutní množství analytu, které odpovídalo 3σ (tříkrát směrodatná odchylka), bylo vyhodnoceno jako mez detekce. Absolutní množství analytu, které odpovídalo 10σ , bylo vyhodnoceno jako mez stanovitelnosti.

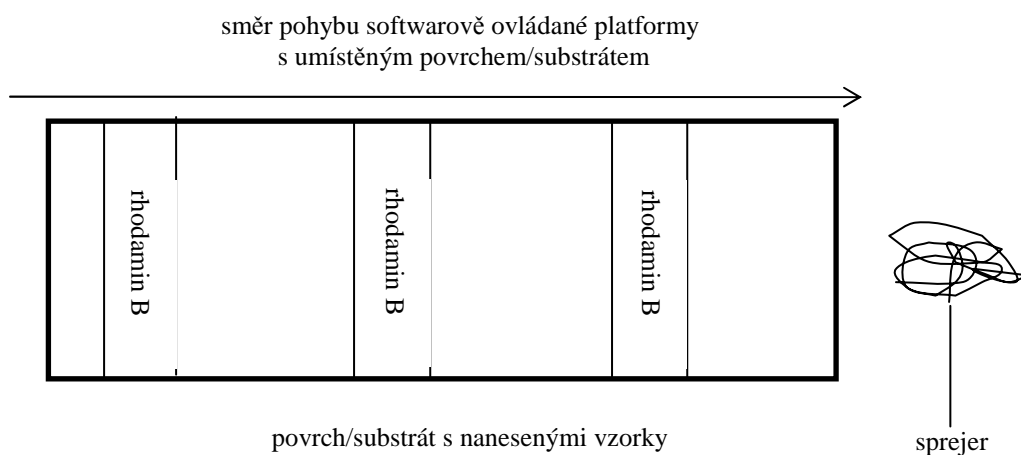
5. Výsledky a diskuze

5.1 Testování platformy

Testování motorizované platformy pro kontinuální sběr hmotnostně-spektrometrických dat v podélné ose vzorku probíhalo s rhodaminem B a kofeinem, jež jsou běžnými testovacími sloučeninami, protože se snadno ionizují. Rhodamin B je navíc nanášen fixem, což zjednodušuje manipulaci.

5.1.1 DESI⁺ rhodaminu B

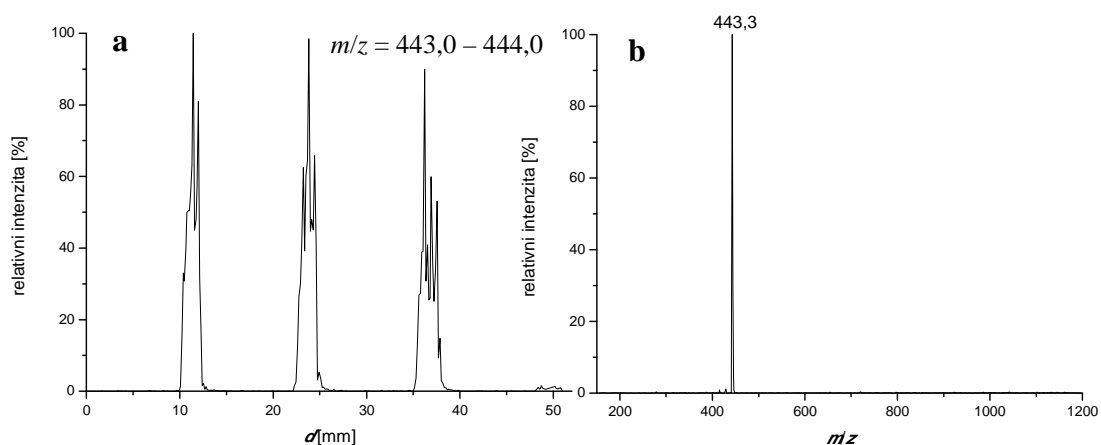
Rhodamin B je sloučeninou, která se při DESI⁺ dobře ionizovala z většiny zkoumaných povrchů. Obr 5.2 znázorňuje spektrum získané po nakreslení třech čar fixem Sharpie, obsahujícím rhodamin B jako majoritní složku, na sklo a následnou analýzou podél linie. Obr 5.3 znázorňuje obdobnou analýzu na TLC desce. Je vidět, že na skle probíhá ionizace s vyšší účinností, se zvýšenou citlivostí a také s lepším poměrem signálu k šumu. Důvodem je pórovitost a nestejnorodost morfologie a mikrostruktury TLC desek. Analyt na TLC desce má navíc afinitu k povrchu (využití v chromatografii), která znesnadňuje jeho účinnou desorpci.



Obr. 5.1 Schéma experimentálního uspořádání DESI⁺ rhodaminu B na skleněné a TLC desce.

Tab. 5.1 Experimentální podmínky DESI⁺ rhodaminu B na skle.

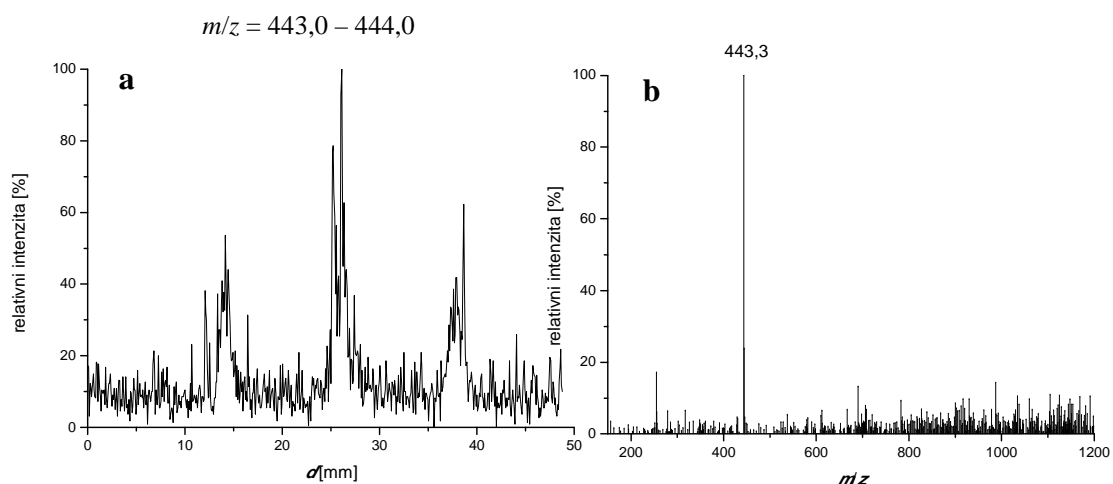
experimentální parametr	hodnota
ambientní ionizační technika	DESI
ionizační mód	pozitivní
d_1	5 mm
d_2	1 mm
d_3	7 mm
α	45 °
sprejovací kapalina	CH ₃ OH
průtok sprejovací kapaliny	6,00 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
rychlost pohybu skleněné desky	0,2 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$
objem vzorku	—
koncentrace vzorku	—



Obr. 5.2 DESI⁺ rhodaminu B na skleněné desce. (a) Závislost intenzity signálu zvoleného rozsahu m/z na vzdálenosti od počátečního bodu analýzy. (b) Hmotnostní spektrum v jednom z píků.

Tab. 5.2 Experimentální podmínky DESI⁺ rhodaminu B na TLC desce.

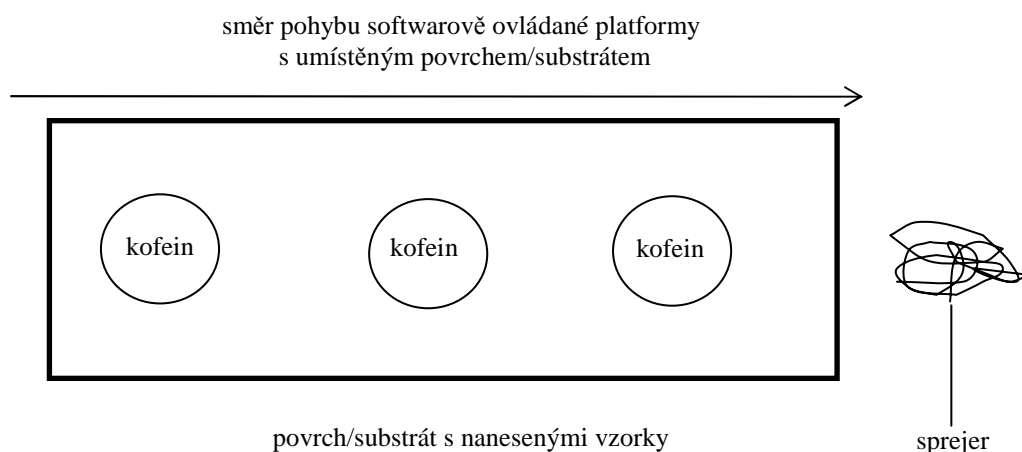
experimentální parametr	hodnota
ambientní ionizační technika	DESI
ionizační mód	pozitivní
d_1	5 mm
d_2	1 mm
d_3	7 mm
α	45 °
sprejovací kapalina	CH ₃ OH
průtok sprejovací kapaliny	8,00 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
rychlost pohybu TLC desky	0,1 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$
objem vzorku	—
koncentrace vzorku	—



Obr. 5.3 DESI⁺ rhodaminu B na TLC desce. (a) Závislost intenzity signálu zvoleného rozsahu m/z na vzdálenosti od počátečního bodu analýzy. (b) Hmotnostní spektrum v jednom z píků.

5.1.2 DESI⁺ kofeinu

Kofein byl sloučeninou, která se při DESI⁺ snadno ionizovala, ale absolutní intenzita signálu byla nižší než v případě rhodaminu B. Jako příklad je uveden Obr. 5.5 zobrazující analýzu kofeinu z Teflonové desky podél linie. Kofein poskytoval výrazný signál $[M+H]^+$ a $[M+Na]^+$.

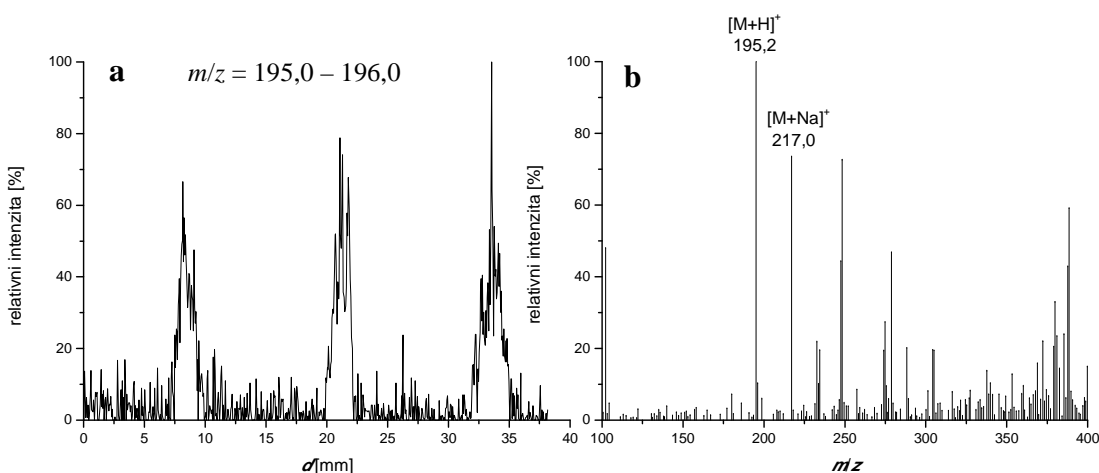


Obr. 5.4 Schéma experimentálního uspořádání DESI⁺ kofeinu na Teflonové desce.

Tab. 5.3 Experimentální podmínky DESI⁺ kofeinu na Teflonové desce.

experimentální parametr	hodnota
ambientní ionizační technika	DESI
ionizační mód	pozitivní
d_1	5 mm

d_2	1 mm
d_3	7 mm
α	45 °
sprejovací kapalina	CH ₃ OH
průtok sprejovací kapaliny	7,00 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
rychlost pohybu Teflonové desky	0,1 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$
objem vzorku	3 · 3,00 μl
koncentrace vzorku	1,00 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$



Obr. 5.5 DESI⁺ kofeinu na Teflonové desce. (a) Závislost intenzity signálu zvoleného rozsahu m/z na vzdálenosti od počátečního bodu analýzy. (b) Hmotnostní spektrum v jednom z piků.

5.2 Analýza fosfolipidů

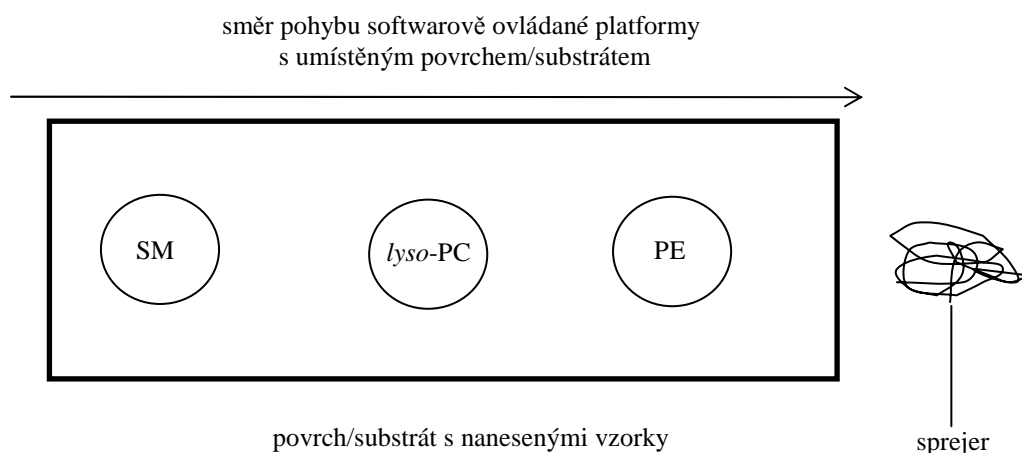
Bylo zkoumáno sedm fosfolipidů. Tři z nich, PE, *lyso*-PC a SM, bylo možno detekovat v DESI⁺ při analýze podél linie. CER bylo možno detekovat pouze při analýze z jednoho bodu, protože při analýze podél linie byla sloučenina sprejována po kratší časový interval, který v tomto případě nebyl dostatečný pro účinnou desorpci a ionizaci. Zbývající fosfolipidy, PS, ST a PA, byly detekovány v DESI⁻ při analýze podél linie.

Fosfolipidy byly detekovány na Teflonové desce, Teflonové fólii, plexiskle, TLC desce i HPTLC desce. Nebyly detekovány pouze na desce nerezové. Vysvětlením může být její elektrická vodivost, která způsobuje vybíjení nabitých kapiček sprejovací kapaliny.

5.2.1 DESI⁺ na Teflonové desce

Studovanými látkami byly PE, *lyso*-PC a SM. Nejvyšší intenzitu signálu poskytoval *lyso*-PC, nejnižší SM. Experiment probíhal v režimu analýzy podél linie a

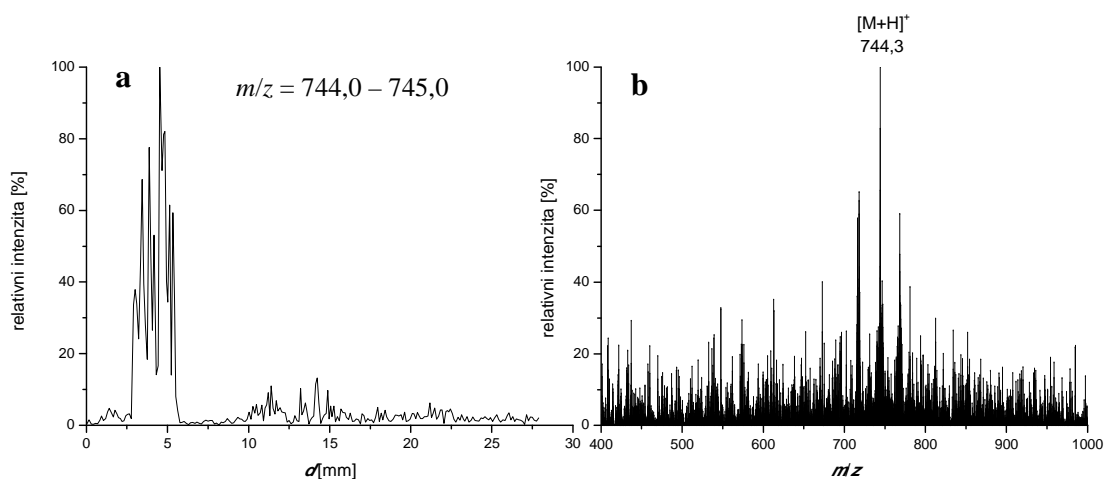
rychlost pohybu Teflonové desky byla $0,2 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$. Používanou sprejovací kapalinou byla $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_3(\text{aq})$ (50/50/0,1; v/v/v). Přídavek vodného roztoku amoniaku podporoval ionizaci v pozitivním módu. Analyzované fosfolipidy poskytovaly výrazný signál $[\text{M}+\text{H}]^+$.

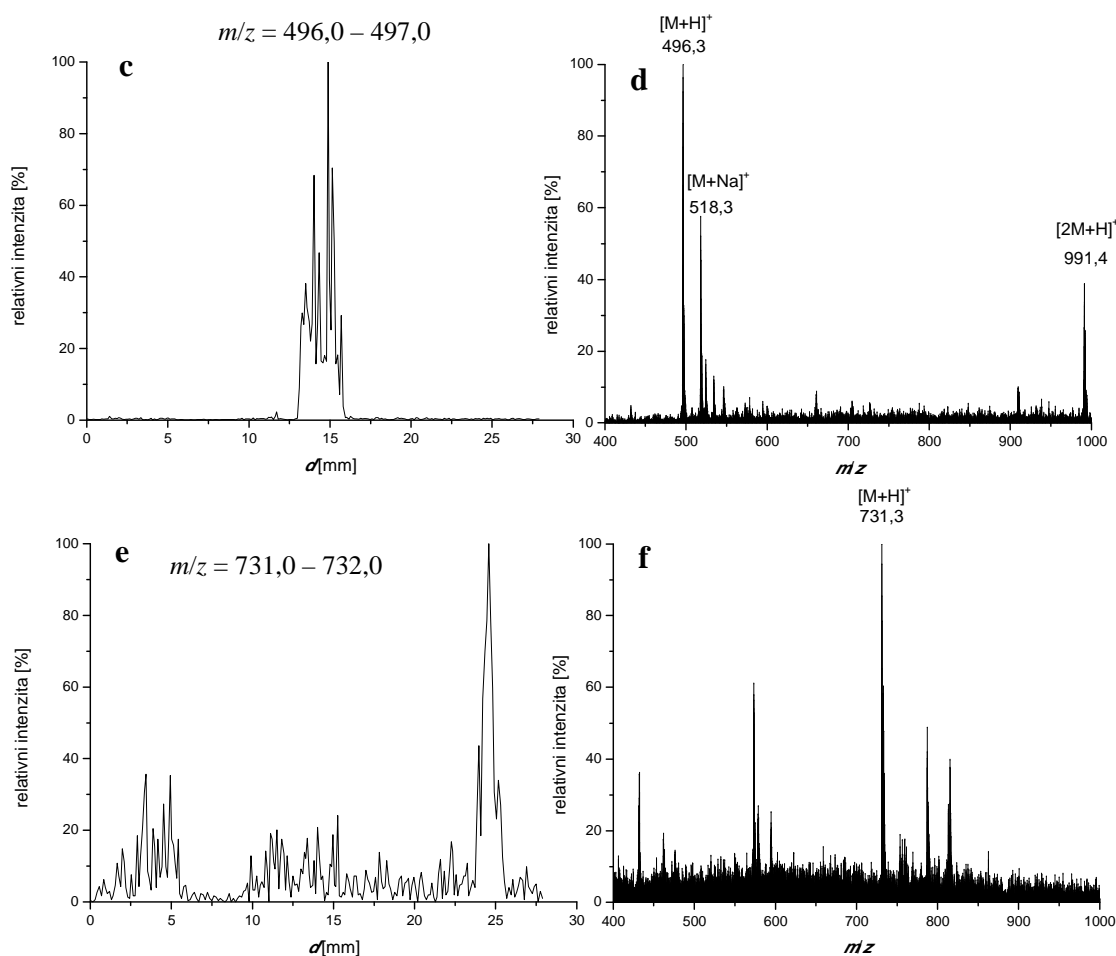


Obr. 5.6 Schéma experimentálního uspořádání DESI⁺ PE, *lyso*-PC a SM na Teflonové desce.

Tab. 5.4 Experimentální podmínky DESI⁺ PE, *lyso*-PC a SM na Teflonové desce.

experimentální parametr	hodnota
ambientní ionizační technika	DESI
ionizační mód	pozitivní
d_1	5 mm
d_2	1 mm
d_3	7 mm
α	45 °
sprejovací kapalina	$\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_3(\text{aq})$ (50/50/0,1; v/v/v)
průtok sprejovací kapaliny	$4,00 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$
rychlost pohybu Teflonové desky	$0,2 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$
objem vzorku	$3 \cdot 0,75 \mu\text{l}$
koncentrace vzorku	$1,00 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$

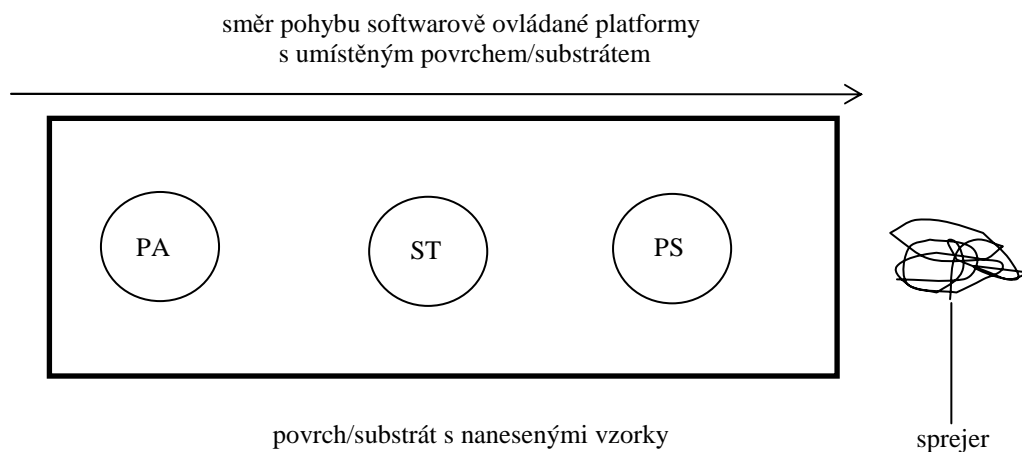




Obr. 5.7 DESI⁺ PE, lyso-PC a SM na Teflonové desce. (a,c,e) Závislost intenzity signálu zvoleného rozsahu m/z na vzdálenosti od počátečního bodu analýzy. (b,d,f) Hmotnostní spektrum v příslušném píku.

5.2.2 DESI⁻ na Teflonové desce

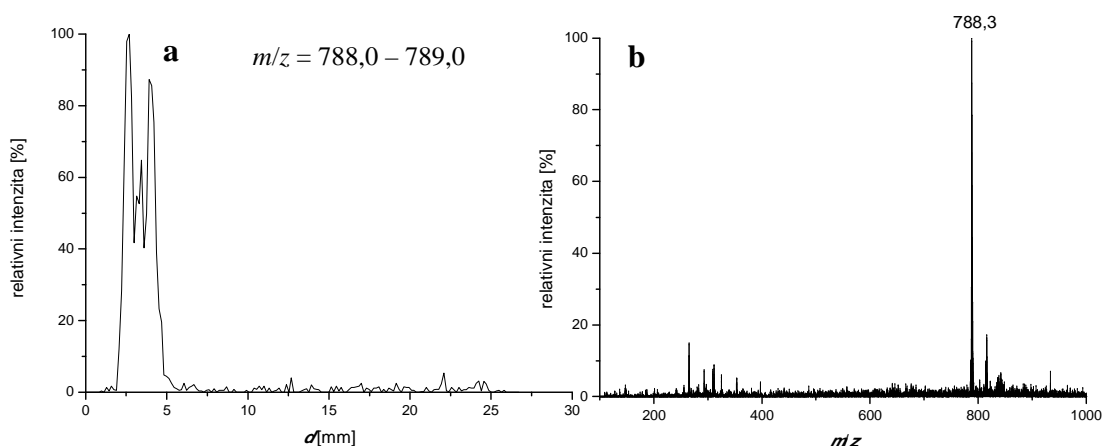
Studovanými látkami byly PS, ST a PA. Nejvyšší intenzitu signálu poskytoval PS, nejnižší ST. Experiment probíhal v režimu analýzy podél linie a rychlost pohybu Teflonové desky byla $0,2 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$. Používanou sprejovací kapalinou byl $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (50/50; v/v).

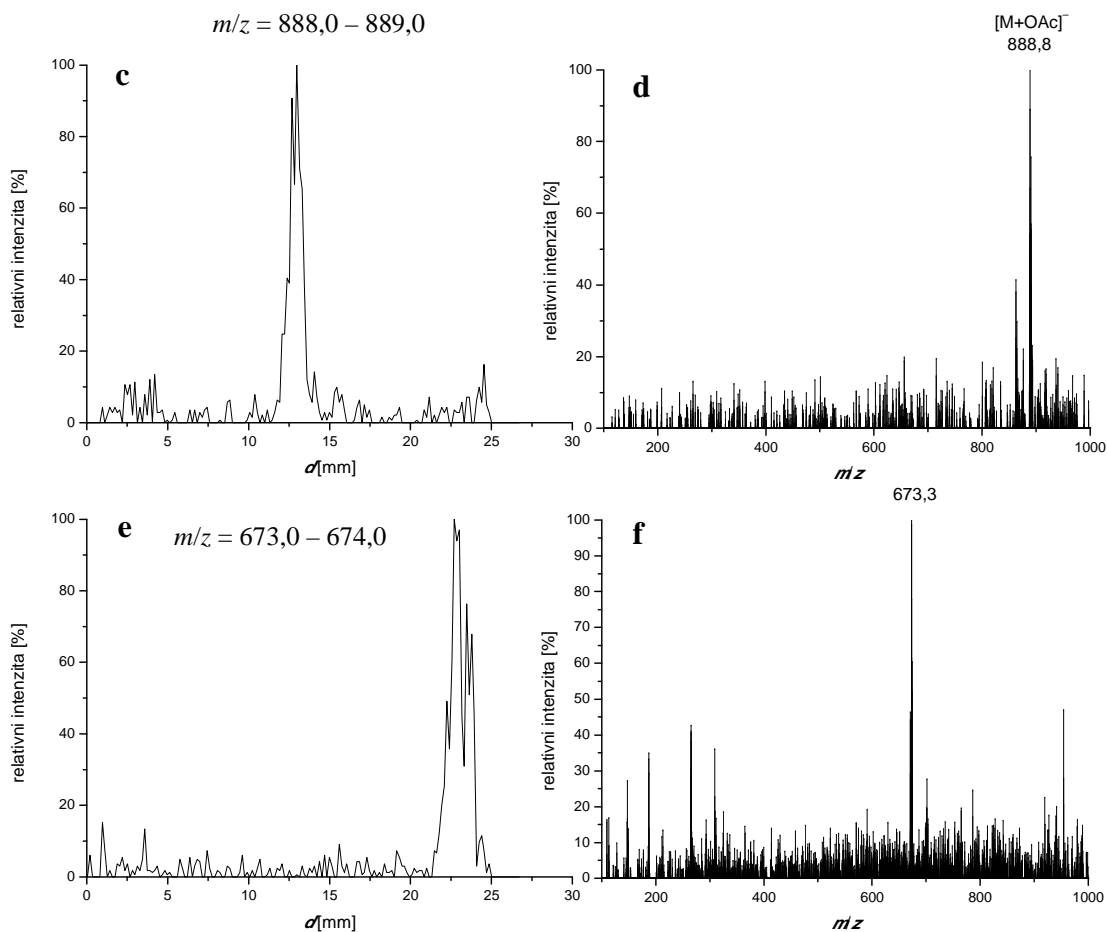


Obr. 5.8 Schéma experimentálního uspořádání DESI⁻ PS, ST a PA na Teflonové desce.

Tab. 5.5 Experimentální podmínky DESI⁻ PS, ST a PA na Teflonové desce.

experimentální parametr	hodnota
ambientní ionizační technika	DESI
ionizační mód	negativní
d_1	5 mm
d_2	1 mm
d_3	7 mm
α	45 °
sprejovací kapalina	CH ₃ OH/H ₂ O (50/50; v/v)
průtok sprejovací kapaliny	7,00 $\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$
rychlost pohybu Teflonové desky	0,2 $\text{mm} \cdot \text{s}^{-1}$
objem vzorku	3 · 2,00 μl
koncentrace vzorku	1,00 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$





Obr. 5.9 DESI⁻ PS, ST a PA na Teflonové desce. (a,c,e) Závislost intenzity signálu zvoleného rozsahu m/z na vzdálenosti od počátečního bodu analýzy. (b,d,f) Hmotnostní spektrum v příslušném píku.

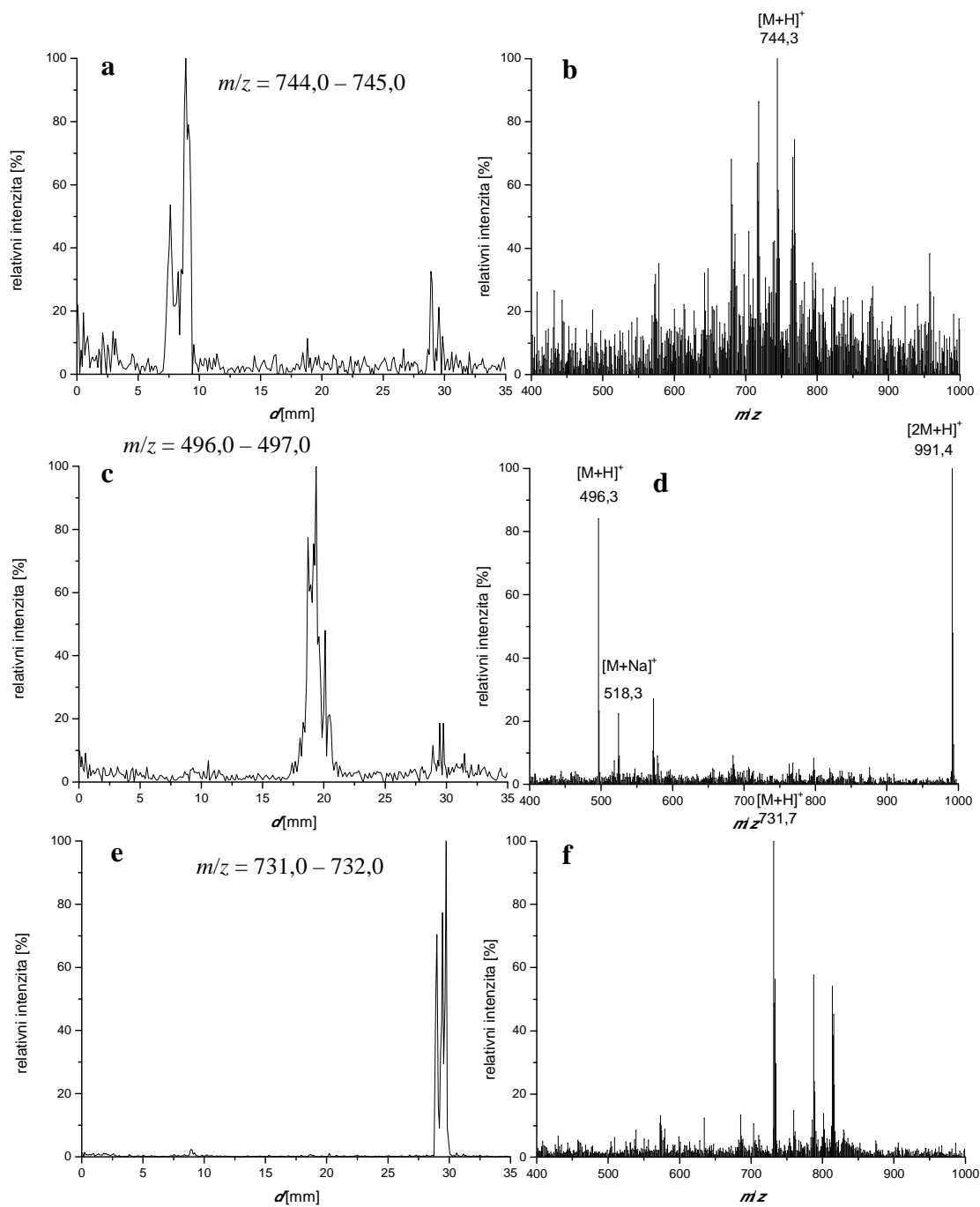
5.2.3 DESI⁺ na Teflonové fólii

Studovanými látkami byly PE, *lyso*-PC a SM. Nejvyšší intenzitu signálu poskytoval *lyso*-PC, nejnižší SM. Experiment probíhal v režimu analýzy podél linie a rychlost pohybu Teflonové fólie byla $0,2 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$. Používanou sprejovací kapalinou byla $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_3(\text{aq})$ (50/50/0,1; v/v/v). Přídavek vodného roztoku amoniaku podporoval ionizaci v pozitivním módu. Analyzované fosfolipidy poskytovaly výrazný signál $[M+H]^+$.

Tab. 5.6 Experimentální podmínky DESI⁺ PE, *lyso*-PC a SM na Teflonové fólii.

experimentální parametr	hodnota
ambientní ionizační technika	DESI
ionizační mód	pozitivní
d_1	3 mm
d_2	1 mm

d_3	5 mm
α	50 °
sprejovací kapalina	CH ₃ OH/H ₂ O/NH ₃ (aq) (50/50/0,1; v/v/v)
průtok sprejovací kapaliny	4,00 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
rychlost pohybu Teflonové fólie	0,2 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$
objem vzorku	3 · 1,00 μl
koncentrace vzorku	1,00 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$



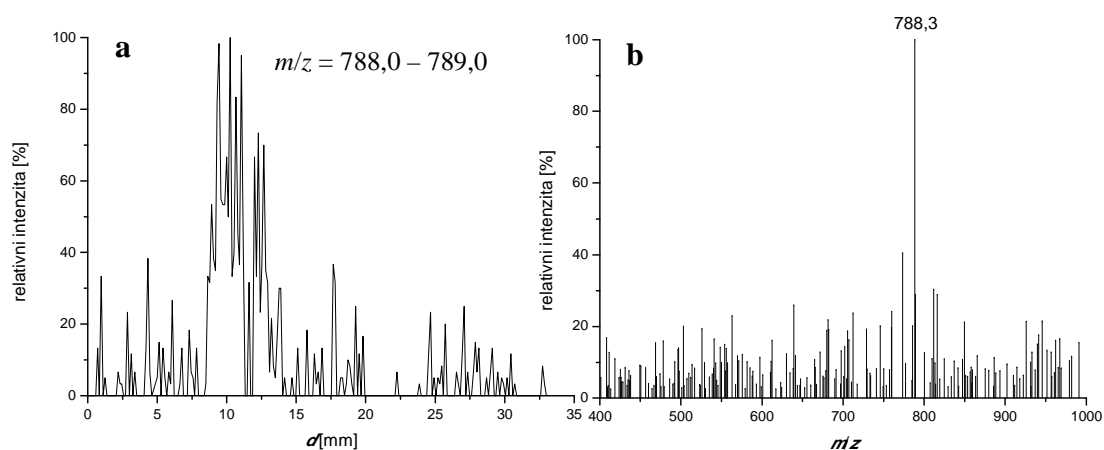
Obr. 5.10 DESI⁺ PE, *lyso*-PC a SM na Teflonové fólii. (a,c,e) Závislost intenzity signálu zvoleného rozsahu m/z na vzdálenosti od počátečního bodu analýzy. (b,d,f) Hmotnostní spektrum v příslušném píku.

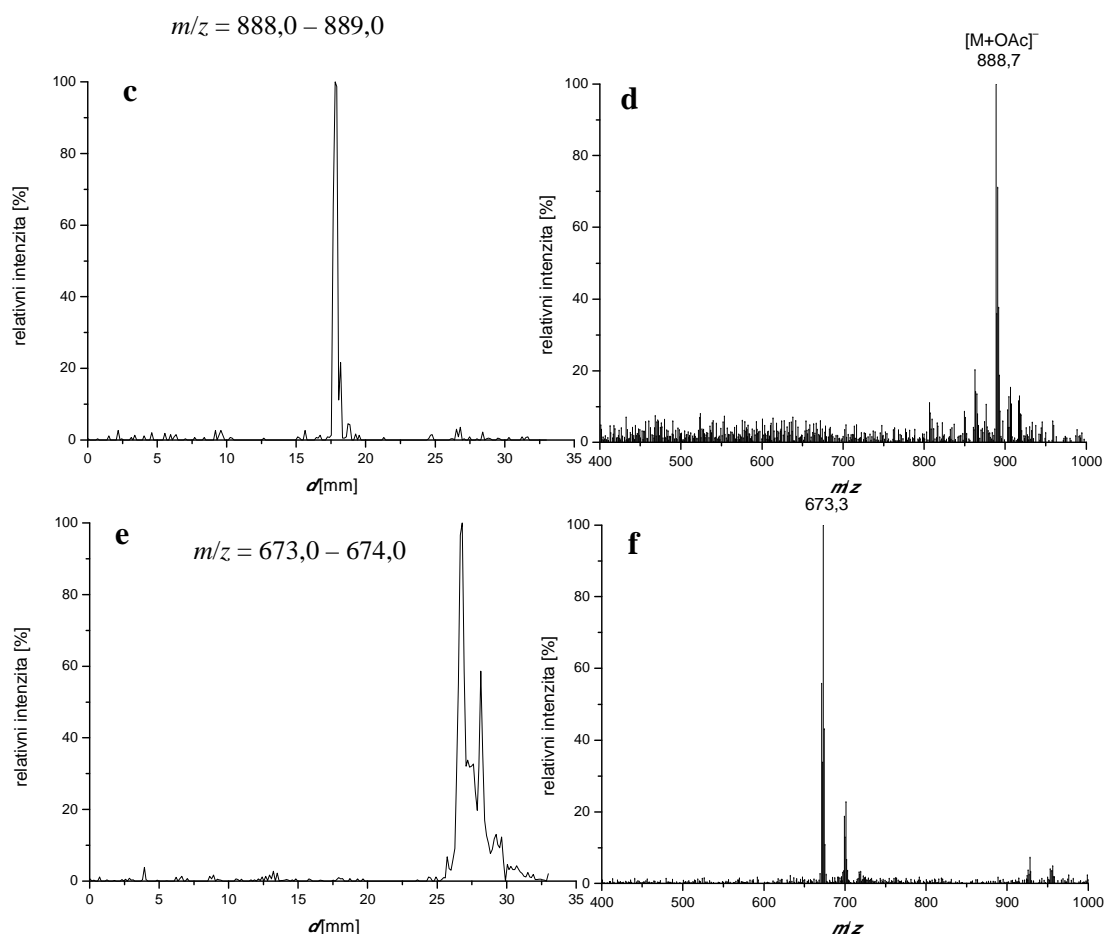
5.2.4 DESI⁻ na Teflonové fólii

Studovanými látkami byly PS, ST a PA. Nejvyšší intenzitu signálu poskytoval PA, nejnižší ST. Experiment probíhal v režimu analýzy podél linie a rychlost pohybu Teflonové fólie byla $0,2 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$. Používanou sprejovací kapalinou byla $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (50/50; v/v).

Tab. 5.7 Experimentální podmínky DESI⁻ PS, ST a PA na Teflonové fólii.

experimentální parametr	hodnota
ambientní ionizační technika	DESI
ionizační mód	negativní
d_1	3 mm
d_2	1 mm
d_3	5 mm
α	50°
sprejovací kapalina	$\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (50/50; v/v)
průtok sprejovací kapaliny	$4,00 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$
rychlost pohybu Teflonové fólie	$0,2 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$
objem vzorku	$3 \cdot 0,75 \mu\text{l}$
koncentrace vzorku	$1,00 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$





Obr. 5.11 DESI⁻ PS, ST a PA na Teflonové fólii. (a,c,e) Závislost intenzity signálu zvoleného rozsahu m/z na vzdálenosti od počátečního bodu analýzy. (b,d,f) Hmotnostní spektrum v příslušném píku.

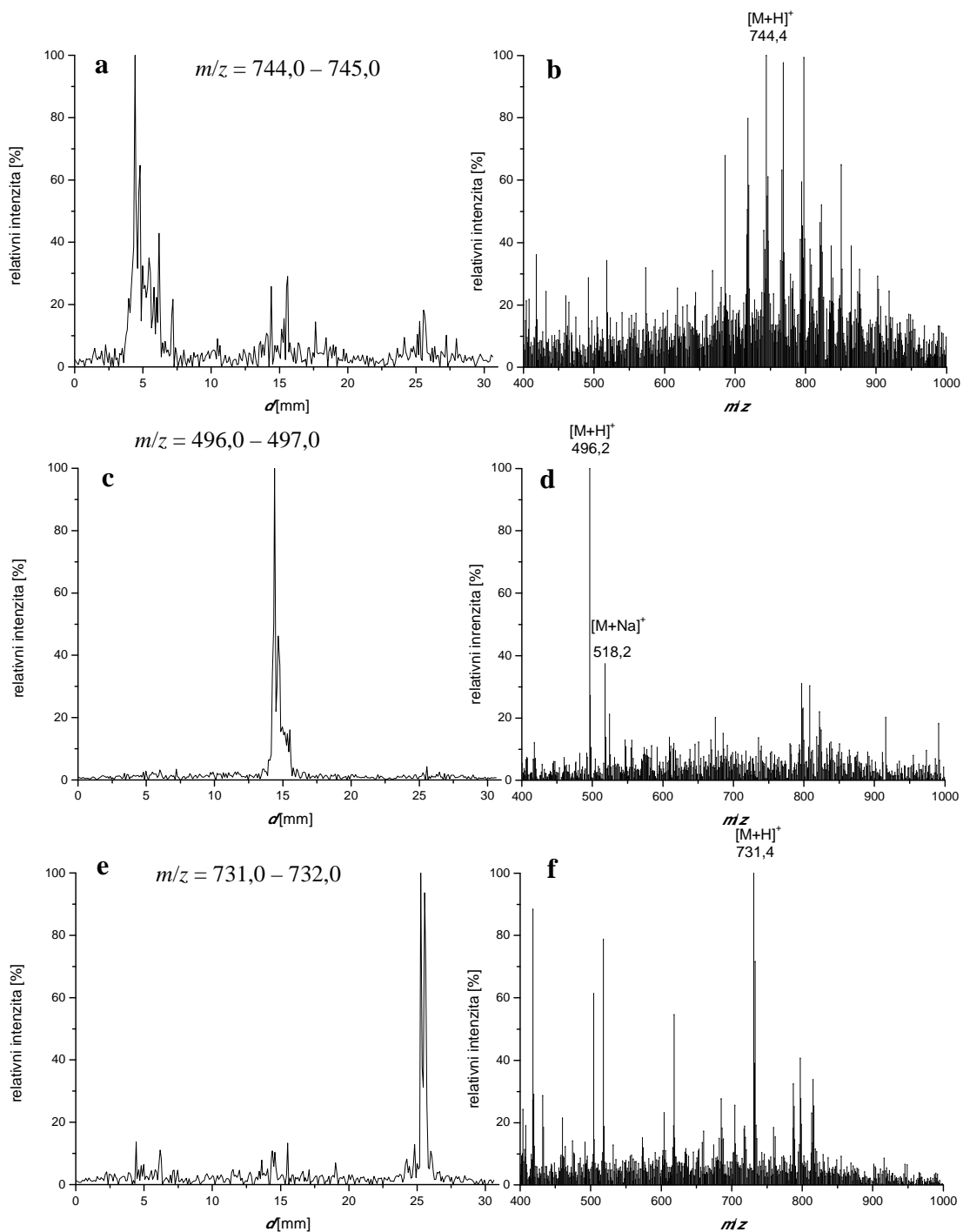
5.2.5 DESI⁺ na plexiskle

Studovanými látkami byly PE, *lyso*-PC a SM. Nejvyšší intenzitu signálu poskytoval *lyso*-PC, nejnižší PE. Experiment probíhal v režimu analýzy podél linie a rychlost pohybu plexiskla byla $0,2 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$. Používanou sprejovací kapalinou byla $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_3(\text{aq})$ (50/50/0,1; v/v/v). Přídavek vodného roztoku amoniaku podporoval ionizaci v pozitivním módu. Spektra z plexiskla byla obdobná jako ta z Teflonové desky a fólie. Analyzované fosfolipidy poskytovaly výrazný signál $[M+H]^+$.

Tab 5.8 Experimentální podmínky DESI⁺ PE, *lyso*-PC a SM na plexiskle.

experimentální parametr	hodnota
ambientní ionizační technika	DESI
ionizační mód	pozitivní

d_1	3 mm
d_2	1 mm
d_3	5 mm
α	50 °
sprejovací kapalina	CH ₃ OH/H ₂ O/NH ₃ (aq) (50/50/0,1; v/v/v)
průtok sprejovací kapaliny	4,00 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
rychlost pohybu plexiskla	0,2 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$
objem vzorku	3 · 0,5 μl
koncentrace vzorku	1,00 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$



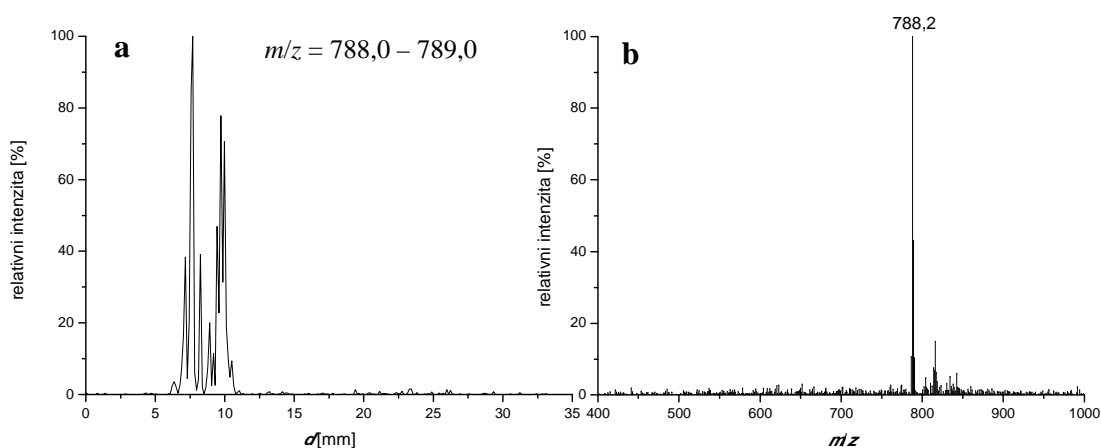
Obr. 5.12 DESI⁺ PE, lyso-PC a SM na plexiskle. (a,c,e) Závislost intenzity signálu zvoleného rozsahu m/z na vzdálenosti od počátečního bodu analýzy. (b,d,f) Hmotnostní spektrum v příslušném píku.

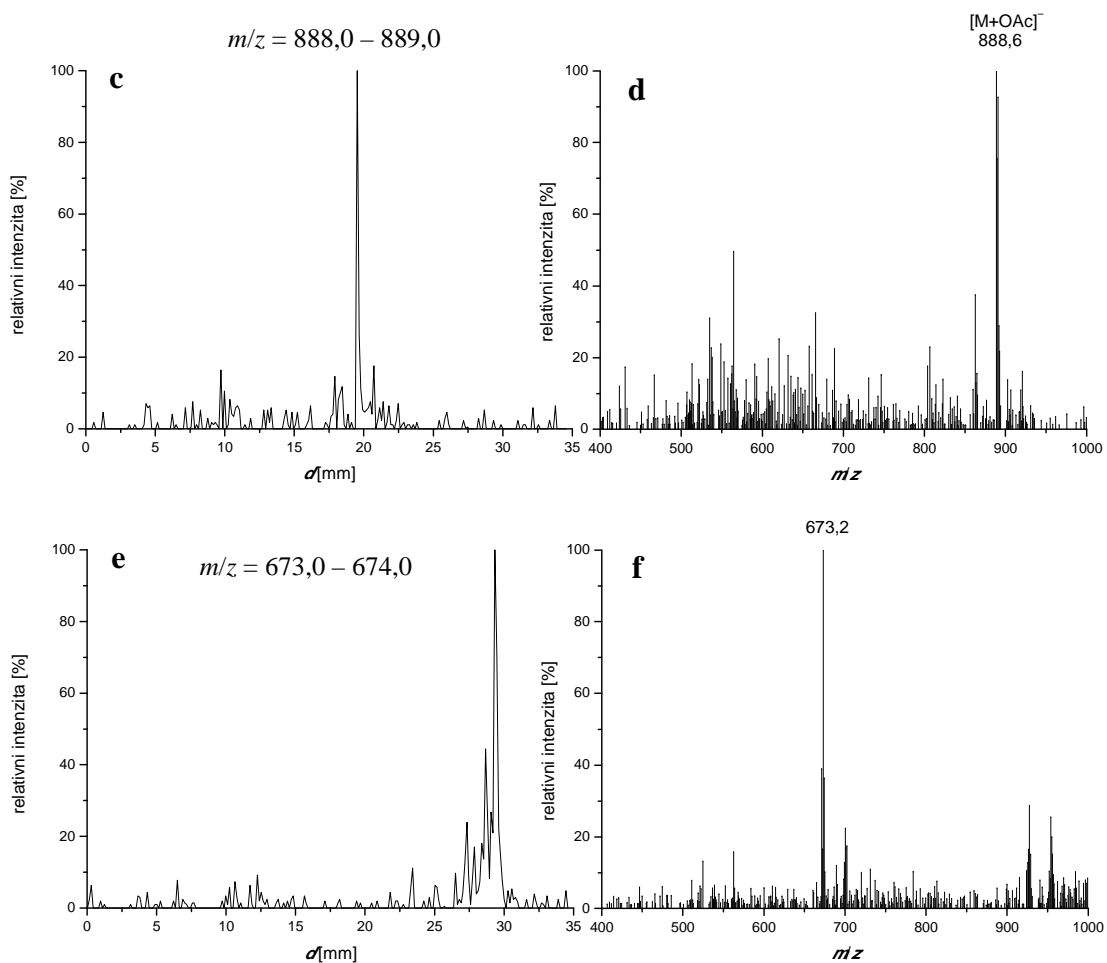
5.2.6 DESI⁻ na plexiskle

Studovanými látkami byly PS, ST a PA. Nejvyšší intenzitu signálu poskytoval PS, nejnižší ST. Experiment probíhal v režimu analýzy podél linie a rychlost pohybu plexiskla byla $0,2 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$. Používanou sprejovací kapalinou byla $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (50/50; v/v). Spektra z plexiskla byla obdobná jako ta z Teflonové desky a fólie.

Tab. 5.9 Experimentální podmínky DESI⁻ PS, ST a PA na plexiskle.

experimentální parametr	hodnota
ambientní ionizační technika	DESI
ionizační mód	negativní
d_1	3 mm
d_2	1 mm
d_3	5 mm
α	50°
sprejovací kapalina	$\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (50/50; v/v)
průtok sprejovací kapaliny	$4,00 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$
rychlost pohybu plexiskla	$0,2 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$
objem vzorku	$0,50 \mu\text{l}$; $0,75 \mu\text{l}$; $0,5 \mu\text{l}$
koncentrace vzorku	$1,00 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$

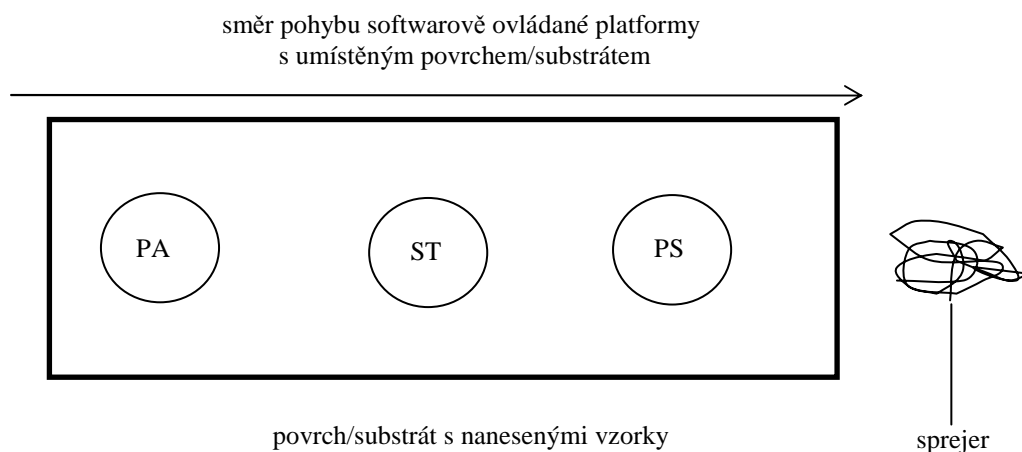




Obr. 5.13 DESI⁻ PS, ST a PA na plexiskle. (a,c,e) Závislost intenzity signálu zvoleného rozsahu m/z na vzdálenosti od počátečního bodu analýzy. (b,d,f) Hmotnostní spektrum v příslušném píku.

5.2.7 DESI⁻ na TLC desce

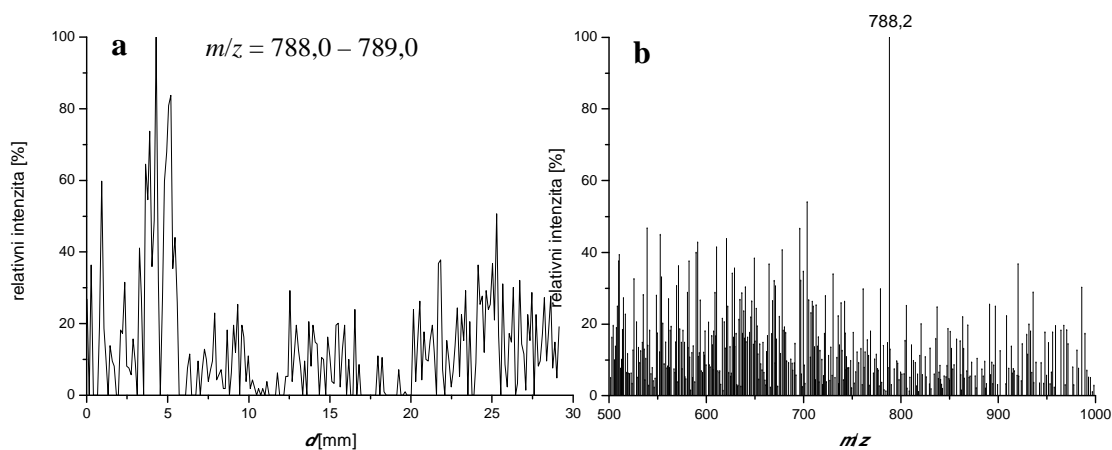
Studovanými látkami byly PS, ST a PA. Intenzita signálu poskytovaná studovanými analyty byla téměř shodná. Experiment probíhal v režimu analýzy podél linie a rychlost pohybu TLC desky byla $0,2 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$. Používanou sprejovací kapalinou byla $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3$ (75/25; v/v). Byl použit vyšší průtok sprejovací kapaliny, protože analyzované sloučeniny na TLC desce měly větší afinitu k povrchu (využití v chromatografii), než při DESI⁻ fosfolipidů na polymerních materiálech, která znesnadňovala jejich účinnou desorpci. Na základě literatury byla použita sprejovací kapalina $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3$ (75/25; v/v).⁹⁴

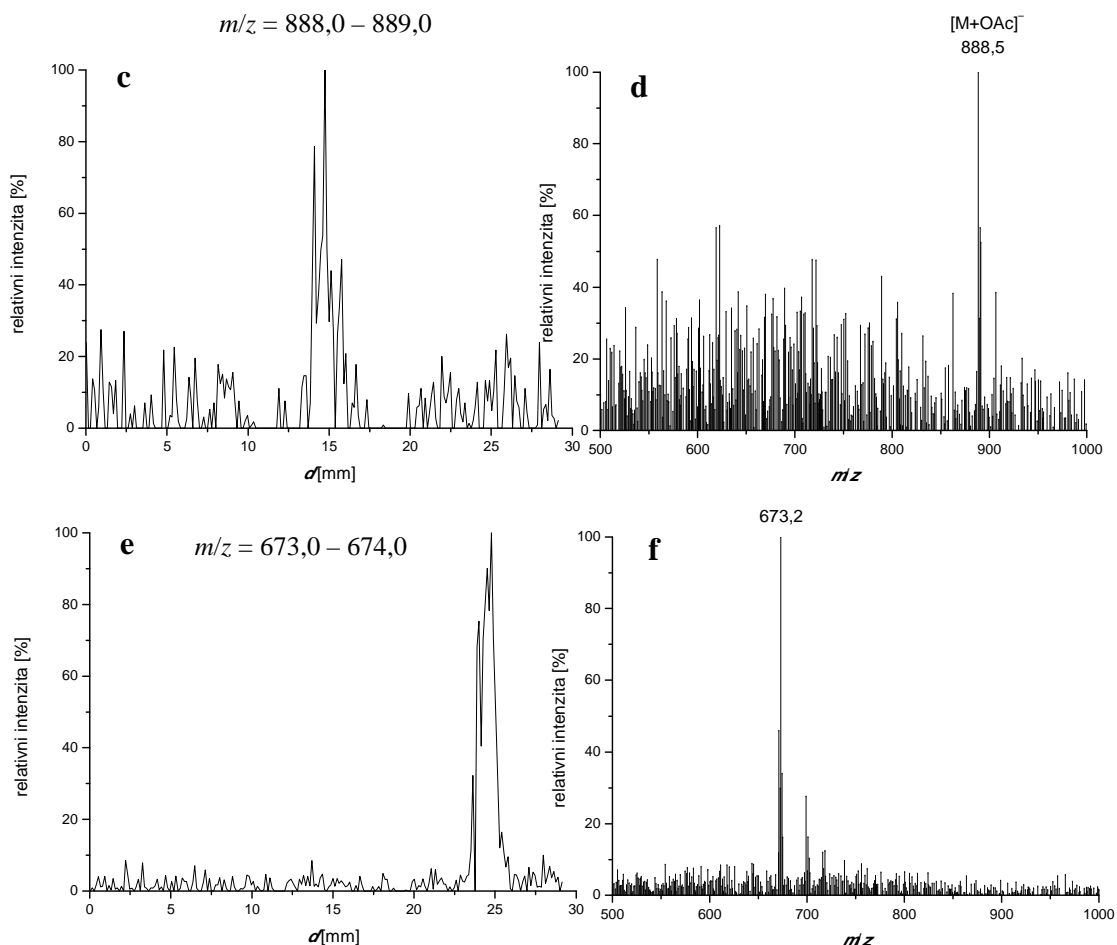


Obr. 5.14 Schéma experimentálního uspořádání DESI⁻ PS, ST a PA na TLC desce.

Tab. 5.10 Experimentální podmínky DESI⁻ PS, ST a PA na TLC desce.

experimentální parametr	hodnota
ambientní ionizační technika	DESI
ionizační mód	negativní
d_1	3 mm
d_2	1 mm
d_3	5 mm
α	50 °
sprejovací kapalina	CH ₃ OH/CHCl ₃ (75/25; v/v)
průtok sprejovací kapaliny	15,00 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
rychlost pohybu TLC desky	0,2 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$
objem vzorku	3 · 1,00 μl
koncentrace vzorku	1,00 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$





Obr. 5.15 DESI⁻ PS, ST a PA na TLC desce. (a,c,e) Závislost intenzity signálu zvoleného rozsahu m/z na vzdálenosti od počátečního bodu analýzy. (b,d,f) Hmotnostní spektrum v příslušném píku.

5.2.8 DESI⁻ na HPTLC desce

Studovanými látkami byly PS, ST a PA. Nejvyšší intenzitu signálu poskytoval PA. Experiment probíhal v režimu analýzy podél linie a rychlost pohybu HPTLC desky byla $0,2 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$. Používanou sprejovací kapalinou byla $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3$ (75/25; v/v). Byl použit vyšší průtok sprejovací kapaliny, protože analyzované sloučeniny na HPTLC desce měly větší afinitu k povrchu (využití v chromatografii), než při DESI⁻ fosfolipidů na polymerních materiálech, která znesnadňovala jejich účinnou desorpci. Na základě literatury byla použita sprejovací kapalina $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3$ (75/25; v/v).⁹⁴

Tab. 5.11 Experimentální podmínky DESI⁻ PS, ST a PA na HPTLC desce.

experimentální parametr	hodnota
ambientní ionizační technika	DESI

ionizační mód

negativní

d_1

3 mm

d_2

1 mm

d_3

5 mm

α

50 °

sprejovací kapalina

CH₃OH/CHCl₃ (75/25; v/v)

průtok sprejovací kapaliny

15,00 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$

rychlost pohybu HPTLC desky

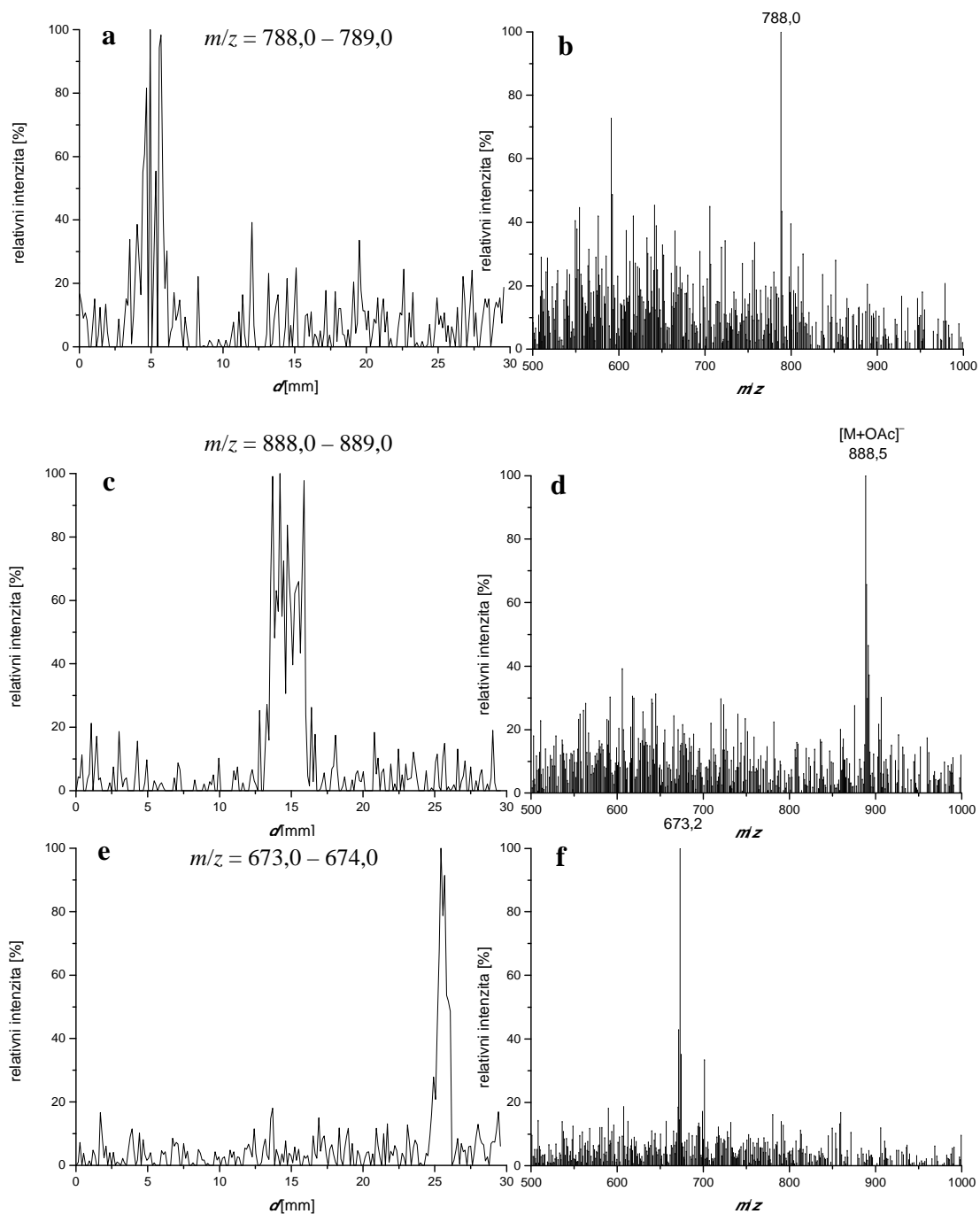
0,2 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$

objem vzorku

3 · 1,00 μl

koncentrace vzorku

1,00 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$



Obr. 5.16 DESI⁻ PS, ST a PA na HPTLC desce. (a,c,e) Závislost intenzity signálu zvoleného rozsahu m/z na vzdálenosti od počátečního bodu analýzy. (b,d,f) Hmotnostní spektrum v příslušném píku.

5.2.9 Porovnání vhodnosti povrchů na základě absolutních hodnot intenzit signálů při DESI⁺ a DESI⁻ analýze fosfolipidů

Jednou z možností, jak porovnat vhodnost různých povrchů pro analýzu, je srovnání nejvyšších změřených absolutních hodnot signálů stejných analytů na různých površích. Pro porovnání nebyly použity průměrné intenzity signálů v průběhu určitého časového intervalu, který by se musel volit pro každý analyt a každou analýzu zvlášť, ani plochy píků, které odpovídají absolutnímu množství (hmotnosti) detekovaného analytu a jsou proto vhodné pro kvantitativní analýzu, ale nejvyšší změřené absolutní hodnoty signálů (výšky píků). I když nejsou tak robustní veličinou, jsou jednodušší a rychlejší na přesné odečtení z chromatogramu a více vypovídají o citlivosti metody.

Tab. 5.12 Nejvyšší změřené absolutní hodnoty signálu daného analytu na daném povrchu v arbitrárních jednotkách.

a

analyt	m/z	intenzita signálu [AU]		
		Teflonová deska	Teflonová fólie	plexisklo
PE	744,0-745,0	$5,9 \cdot 10^2$	$5,4 \cdot 10^2$	$1,9 \cdot 10^3$
lyso-PC	496,0-497,0	$1,8 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^3$	$7,5 \cdot 10^3$
SM	731,0-732,0	$1,1 \cdot 10^2$	$4,3 \cdot 10^2$	$3,6 \cdot 10^3$

b

analyt	m/z	intenzita signálu [AU]				
		Teflonová deska	Teflonová fólie	plexisklo	TLC deska	HPTLC deska
PS	788,0-789,0	$10,0 \cdot 10^1$	$6,0 \cdot 10^2$	$1,3 \cdot 10^3$	$2,1 \cdot 10^2$	$3,0 \cdot 10^2$
ST	888,0-889,0	$2,9 \cdot 10^1$	$5,3 \cdot 10^2$	$1,7 \cdot 10^2$	$2,3 \cdot 10^2$	$3,2 \cdot 10^2$
PA	673,0-674,0	$3,4 \cdot 10^1$	$1,2 \cdot 10^3$	$2,1 \cdot 10^2$	$1,3 \cdot 10^2$	$6,3 \cdot 10^2$

Tab. 5.12a ukazuje, že na základě porovnání nejvyšších změřených absolutních hodnot signálů se plexisklo pro DESI⁺ analýzu fosfolipidů podél linie jeví jako nejvhodnější povrch. Oba Teflonové povrchy ukazují srovnatelné výsledky.

Tab. 5.12b ukazuje, že na základě porovnání nejvyšších změřených absolutních hodnot signálů se Teflonová fólie a plexisklo pro DESI⁻ analýzu fosfolipidů podél linie jeví jako nejvhodnější povrchy. Za nimi následují TLC a HPTLC desky poskytující podobné výsledky. Nejnižší intenzity signálu byly získány z Teflonové desky.

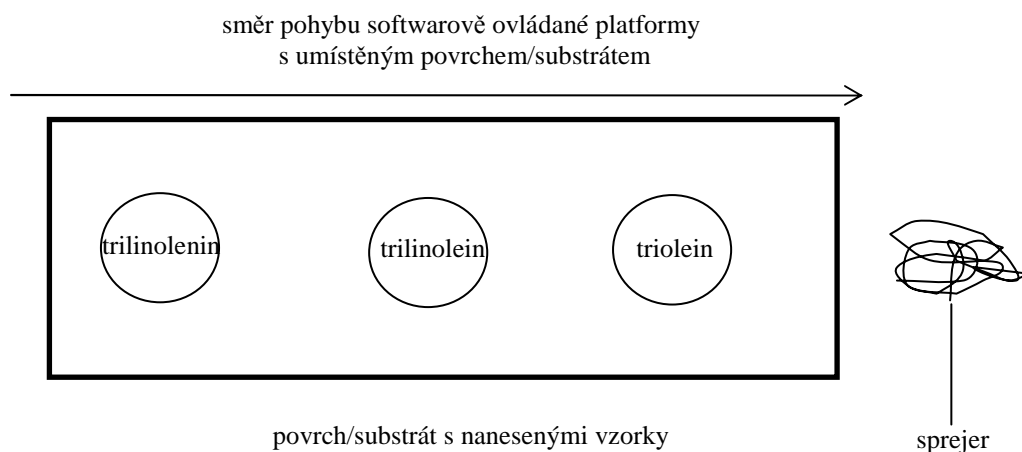
5.3. Analýza triacylglycerolů, voskových esterů a mastné kyseliny

Byly zkoumány triacylglyceroly tristearin, triolein, trilinolein a trilinolenin, které se navzájem liší počtem dvojných vazeb v uhlovodíkovém řetězci. Z voskových esterů byly analyzovány behenyl behenát a palmityl oleát a dále také kyselina palmitová. Byla zkoušena i analýza nenasyceného uhlovodíku *cis*-9-trikosenu, jenž byl ale sloučeninou příliš nepolární a nebyl proto ionizován.

Analýza probíhala na Teflonové desce, Teflonové fólii, plexiskle, TLC desce a HPTLC desce.

5.3.1 DESI⁺ na Teflonové desce

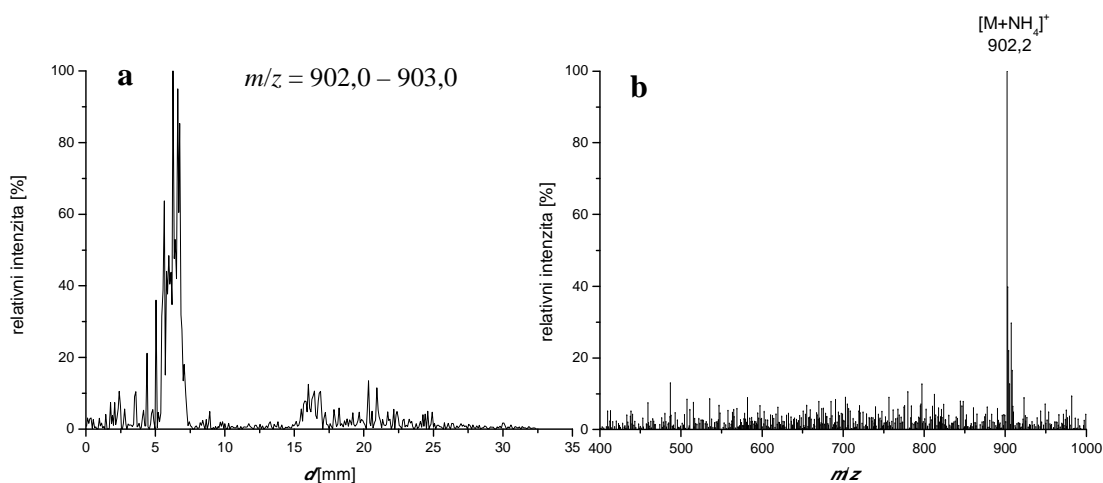
Studovanými látkami byly triolein, trilinolein a trilinolenin. Nejvyšší intenzitu signálu poskytoval triolein, nejnižší trilinolenin. Experiment probíhal v režimu analýzy podél linie a rychlost pohybu Teflonové desky byla 0,2 mm·s⁻¹. Používanou sprejovací kapalinou byla CH₃OH/H₂O/NH₃(aq) (50/50/0,1; v/v/v). Přídavek vodného roztoku amoniaku podporoval ionizaci v pozitivním módu. Analyzované triacylglyceroly poskytovaly výrazný signál [M+NH₄]⁺.

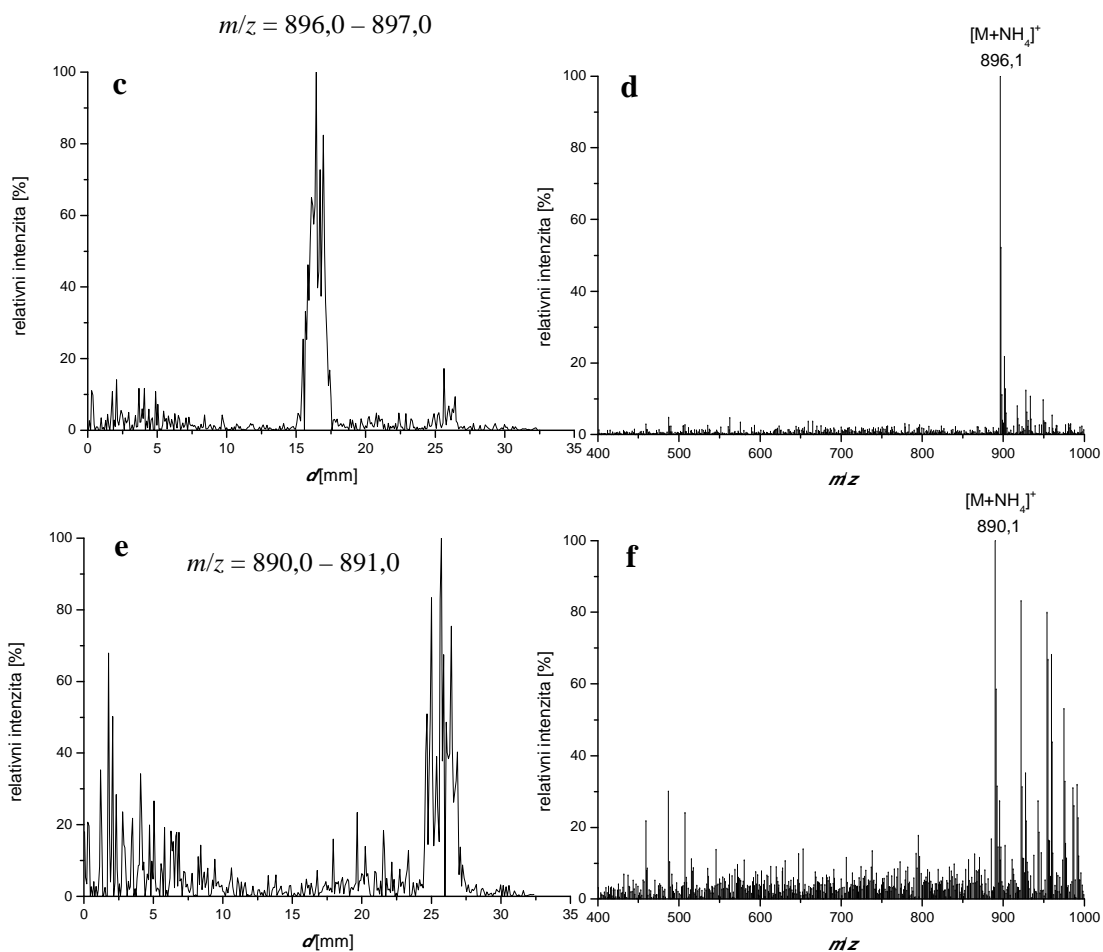


Obr. 5.17 Schéma experimentálního uspořádání DESI⁺ trioleinu, trilinoleinu a trilinoleninu na Teflonové desce.

Tab. 5.13 Experimentální podmínky DESI⁺ trioleinu, trilinoleinu a trilinoleninu na Teflonové desce.

experimentální parametr	hodnota
ambientní ionizační technika	DESI
ionizační mód	pozitivní
d_1	3 mm
d_2	1 mm
d_3	5 mm
α	50 °
sprejovací kapalina	CH ₃ OH/H ₂ O/NH ₃ (aq) (50/50/0,1; v/v/v)
průtok sprejovací kapaliny	4,00 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
rychlost pohybu Teflonové desky	0,2 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$
objem vzorku	3 · 0,75 μl
koncentrace vzorku	1,00 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$





Obr. 5.18 DESI⁺ trioleinu, trilinoleinu a trilinoleninu na Teflonové desce. (a,c,e) Závislost intenzity signálu zvoleného rozsahu m/z na vzdálenosti od počátečního bodu analýzy. (b,d,f) Hmotnostní spektrum v příslušném píku.

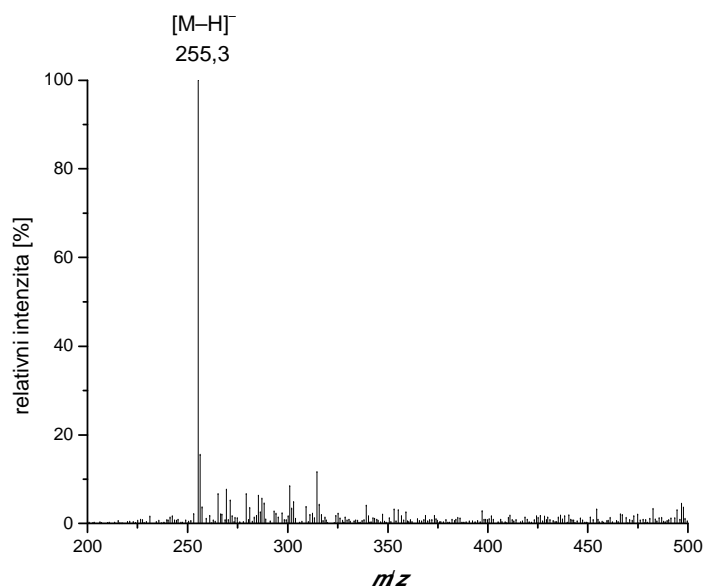
5.3.2 DESI⁻ na Teflonové desce (analýza z jednoho bodu)

Studovaným analytem byla kyselina palmitová. Experiment probíhal v režimu analýzy z jednoho bodu a v negativním módu, protože kyseliny snadno podléhají deprotonaci. Používanou sprejovací kapalinou byla CH₃OH/H₂O (50/50; v/v). Kyselina palmitová poskytovala výrazný signál $[M-H]^-$.

Tab. 5.14 Experimentální podmínky DESI⁻ kyseliny palmitové na Teflonové desce v režimu analýzy z jednoho bodu.

experimentální parametr	hodnota
ambientní ionizační technika	DESI
ionizační mód	negativní
d_1	3 mm
d_2	1 mm
d_3	5 mm
α	50 °

sprejovací kapalina	CH ₃ OH/H ₂ O (50/50; v/v)
průtok sprejovací kapaliny	4,00 μl·min ⁻¹
objem vzorku	1,00 μl
koncentrace vzorku	1,00 mg·ml ⁻¹



Obr. 5.19 Hmotnostní spektrum kyseliny palmitové získané DESI⁻ na Teflonové desce v režimu analýzy z jednoho bodu.

5.3.3 DESI⁺ na Teflonové fólii

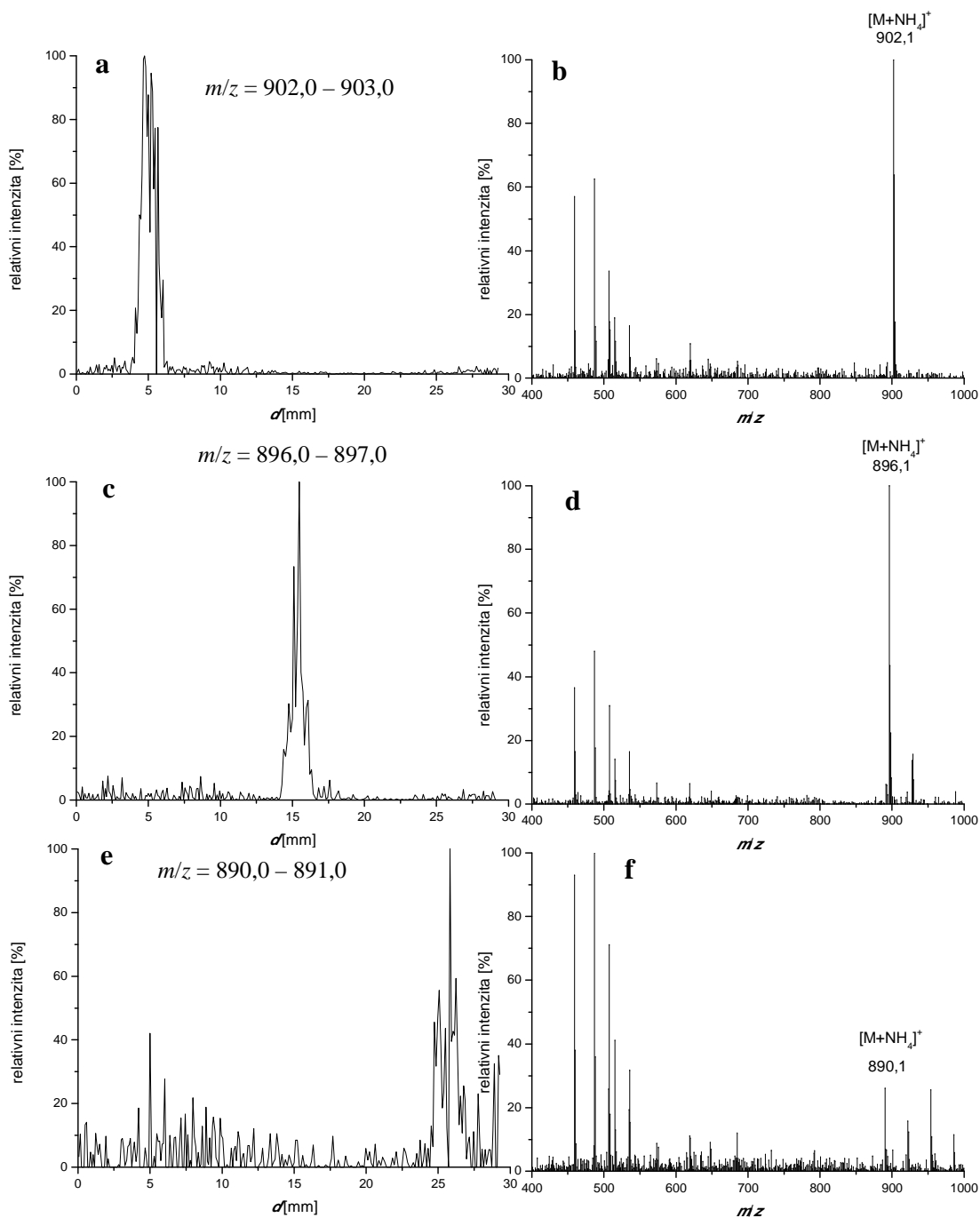
Studovanými látkami byly triolein, trilinolein a trilinolenin. Nejvyšší intenzitu signálu poskytoval triolein, nejnižší trilinolenin. Experiment probíhal v režimu analýzy podél linie a rychlost pohybu Teflonové fólie byla 0,2 mm·s⁻¹. Používanou sprejovací kapalinou byla CH₃OH/H₂O/NH₃(aq) (50/50/0,1; v/v/v). Přídavek vodného roztoku amoniaku podporoval ionizaci v pozitivním módu. Analyzované triacylglyceroly poskytovaly výrazný signál $[M+NH_4]^+$.

Tab. 5.15 Experimentální podmínky DESI⁺ trioleinu, trilinoleinu a trilinoleninu na Teflonové fólii.

experimentální parametr	hodnota
ambientní ionizační technika	DESI
ionizační mód	pozitivní
d_1	3 mm
d_2	1 mm
d_3	5 mm
α	50 °
sprejovací kapalina	CH ₃ OH/H ₂ O/NH ₃ (aq) (50/50/0,1; v/v/v)
průtok sprejovací kapaliny	4,00 μl·min ⁻¹
rychlost pohybu Teflonové fólie	0,2 mm·s ⁻¹

objem vzorku
koncentrace vzorku

$3 \cdot 1,00 \mu\text{l}$
 $1,00 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$



Obr. 5.20 DESI⁺ trioleinu, trilinoleinu a trilinoleninu na Teflonové fólii. (a,c,e) Závislost intenzity signálu zvoleného rozsahu m/z na vzdálenosti od počátečního bodu analýzy. (b,d,f) Hmotnostní spektrum v příslušném píku.

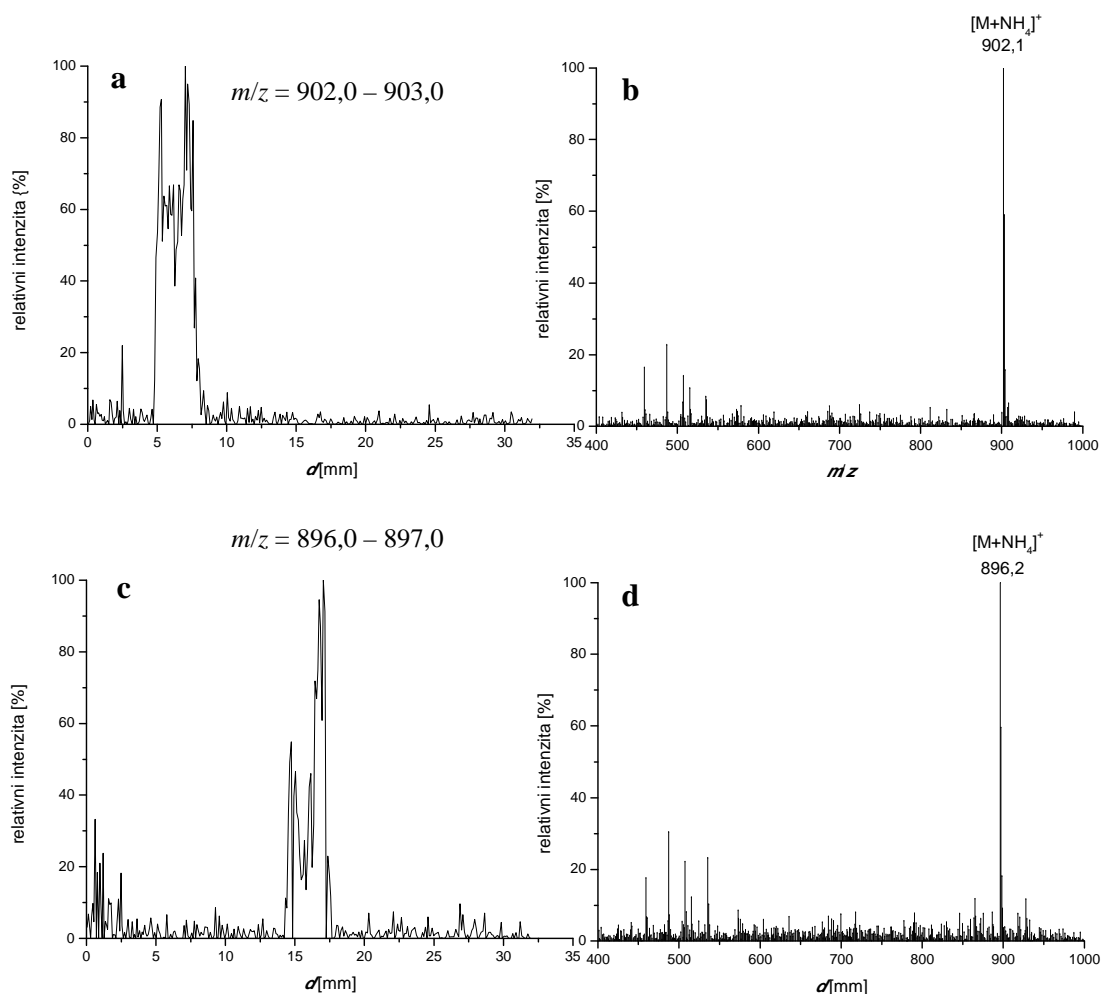
5.3.4 DESI⁺ na plexiskle

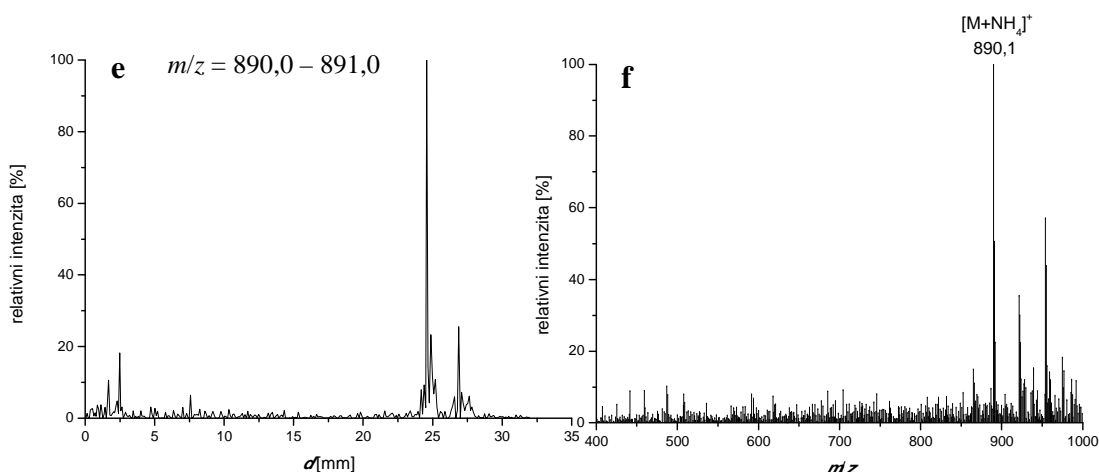
Studovanými látkami byly triolein, trilinolein a trilinolenin. Nejvyšší intenzitu signálu poskytoval triolein, nejnižší trilinolenin. Experiment probíhal

v režimu analýzy podél linie a rychlost pohybu plexiskla byla $0,2 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$. Používanou sprejovací kapalinou byla $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_3(\text{aq})$ (50/50/0,1; v/v/v). Přídavek vodného roztoku amoniaku podporoval ionizaci v pozitivním módu. Spektra z plexiskla byla obdobná jako ta z Teflonové desky a fólie. Analyzované triacylglyceroly poskytovaly výrazný signál $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$.

Tab. 5.16 Experimentální podmínky DESI⁺ trioleinu, trilinoleinu a trilinoleninu na plexiskle.

experimentální parametr	hodnota
ambientní ionizační technika	DESI
ionizační mód	pozitivní
d_1	3 mm
d_2	1 mm
d_3	5 mm
α	50°
sprejovací kapalina	$\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_3(\text{aq})$ (50/50/0,1; v/v/v)
průtok sprejovací kapaliny	$4,00 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
rychlost pohybu plexiskla	$0,2 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$
objem vzorku	$3 \cdot 0,75 \mu\text{l}$
koncentrace vzorku	$1,00 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$





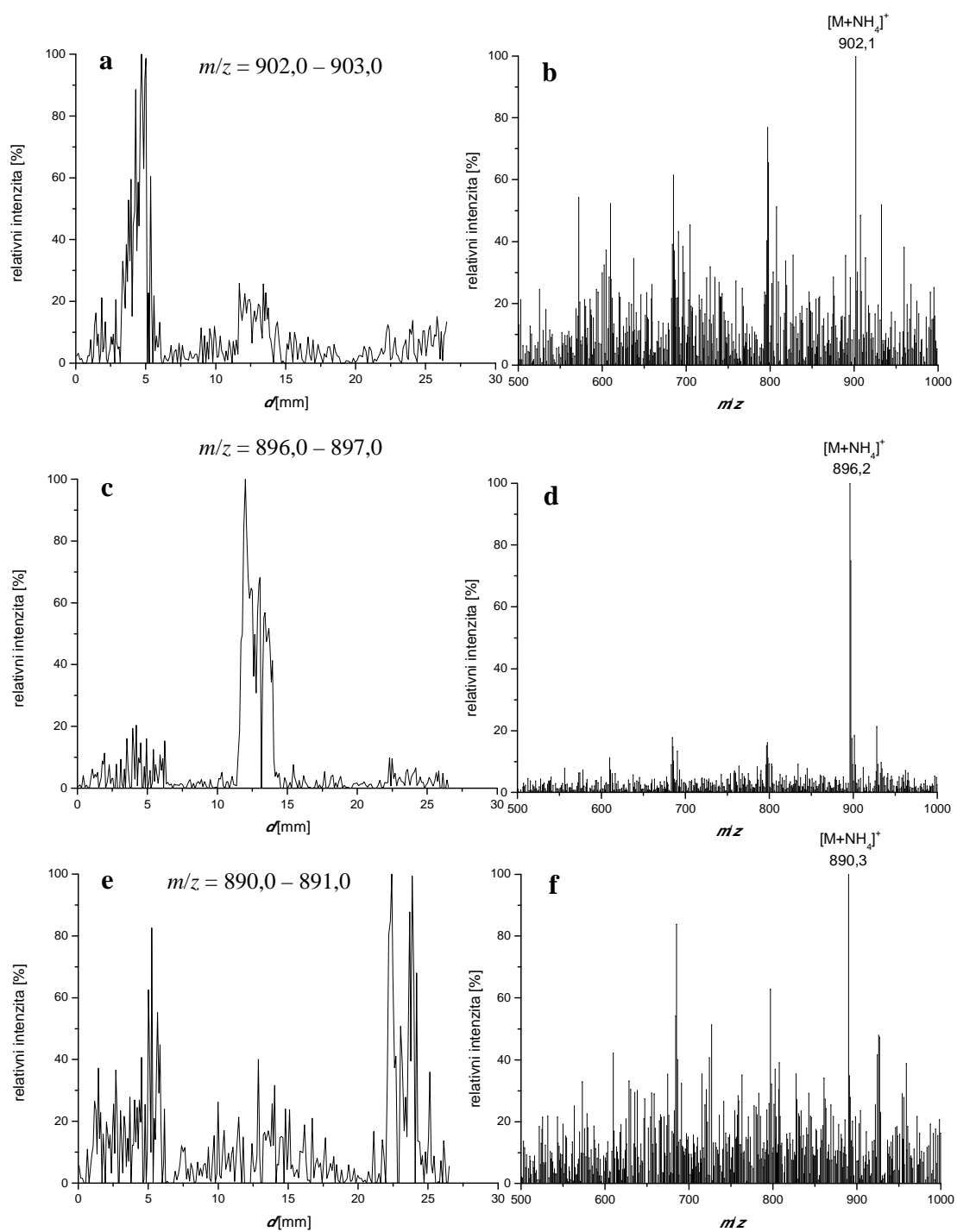
Obr. 5.21 DESI⁺ trioleinu, trilinoleinu a trilinoleninu na plexiskle. (a,c,e) Závislost intenzity signálu zvoleného rozsahu m/z na vzdálenosti od počátečního bodu analýzy. (b,d,f) Hmotnostní spektrum v příslušném píku.

5.3.5 DESI⁺ na TLC desce

Studovanými látkami byly triolein, trilinolein a trilinolenin. Nejvyšší intenzitu signálu poskytoval trilinolein, nejnižší trilinolenin. Experiment probíhal v režimu analýzy podél linie a rychlost pohybu TLC desky byla $0,2 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$. Používanou sprejovací kapalinou byl CH_3OH . Byl použit vyšší průtok sprejovací kapaliny, protože analyzované sloučeniny na TLC desce měly větší afinitu k povrchu (využití v chromatografii), než při DESI⁺ triacylglycerolů na polymerních materiálech, která znesnadňovala jejich účinnou desorpci. Analyzované triacylglyceroly poskytovaly výrazný signál $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$.

Tab. 5.17 Experimentální podmínky DESI⁺ trioleinu, trilinoleinu a trilinoleninu na TLC desce.

experimentální parametr	hodnota
ambientní ionizační technika	DESI
ionizační mód	pozitivní
d_1	3 mm
d_2	1 mm
d_3	5 mm
α	50°
sprejovací kapalina	CH_3OH
průtok sprejovací kapaliny	$15,00 \text{ } \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$
rychlost pohybu TLC desky	$0,2 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$
objem vzorku	$3 \cdot 1,00 \text{ } \mu\text{l}$
koncentrace vzorku	$1,00 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$



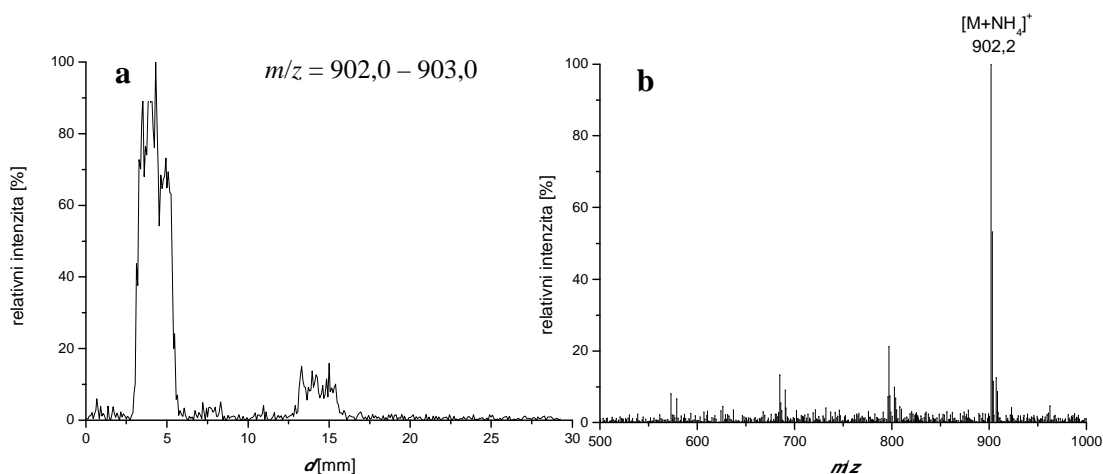
Obr. 5.22 DESI⁺ trioleinu, trilinoleinu a trilinoleninu na TLC desce. (a,c,e) Závislost intenzity signálu zvoleného rozsahu m/z na vzdálenosti od počátečního bodu analýzy. (b,d,f) Hmotnostní spektrum v příslušném píku.

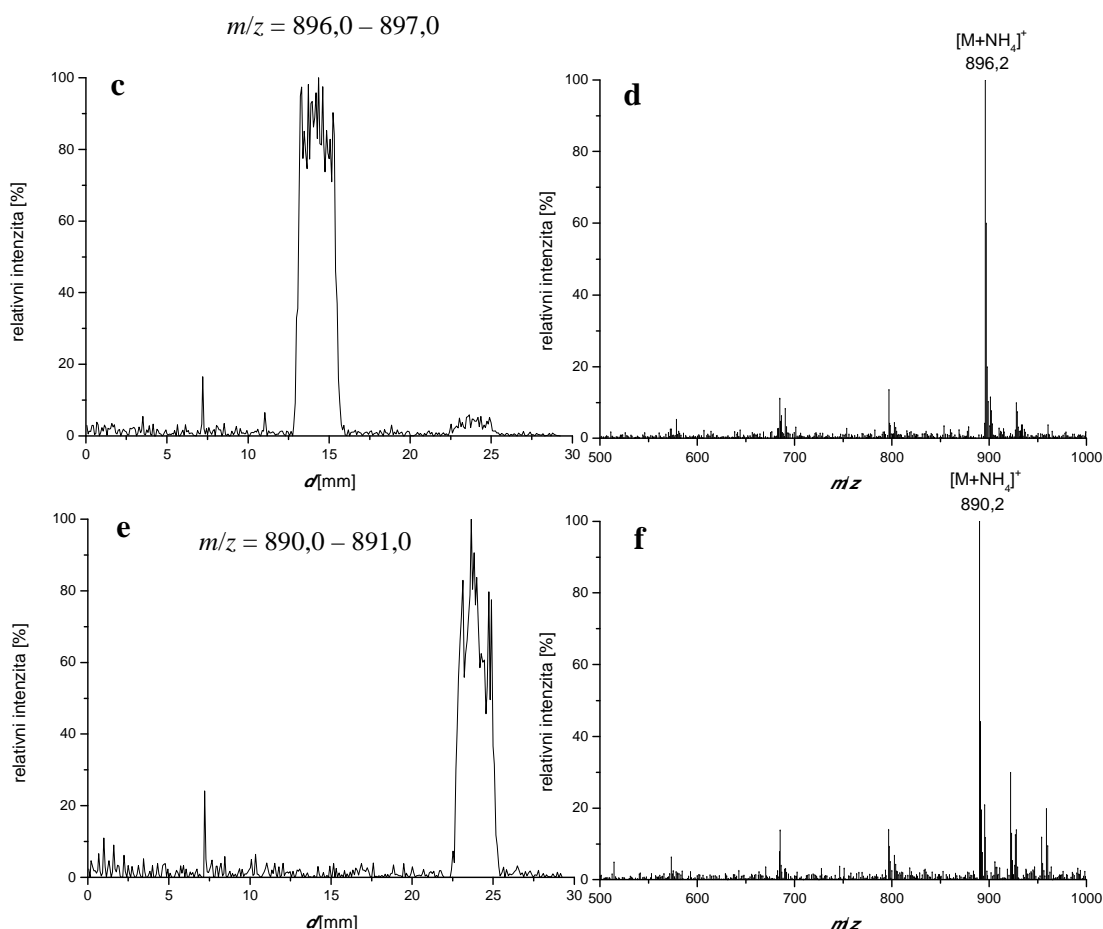
5.3.6 DESI⁺ na HPTLC desce

Studovanými látkami byly triolein, trilinolein a trilinolenin. Nejvyšší intenzitu signálu poskytoval trilinolenin. Experiment probíhal v režimu analýzy podél linie a rychlost pohybu HPTLC desky byla 0,2 mm·s⁻¹. Používanou sprejovací kapalinou byl CH₃OH. Byl použit vyšší průtok sprejovací kapaliny, protože analyzované sloučeniny na HPTLC desce měly větší afinitu k povrchu (využití v chromatografii), než při DESI⁺ triacylglycerolů na polymerních materiálech, která znesnadňovala jejich účinnou desorpci. V porovnání s TLC deskou bylo dosaženo vyšších hodnot intenzit signálu a lepšího poměr signálu k šumu. Důvodem je užší distribuce velikostí zrn, jejich menší velikost, definovanější struktura celé desky a z toho vyplývající menší difúze aplikovaných roztoků. Analyzované triacylglyceroly poskytovaly výrazný signál [M+NH₄]⁺.

Tab. 5.18 Experimentální podmínky DESI⁺ trioleinu, trilinoleinu a trilinoleninu na HPTLC desce.

experimentální parametr	hodnota
ambientní ionizační technika	DESI
ionizační mód	pozitivní
d_1	3 mm
d_2	1 mm
d_3	5 mm
α	50 °
sprejovací kapalina	CH ₃ OH
průtok sprejovací kapaliny	15,00 μl·min ⁻¹
rychlost pohybu HPTLC desky	0,2 mm·s ⁻¹
objem vzorku	3 · 1,00 μl
koncentrace vzorku	1,00 mg·ml ⁻¹





Obr. 5.23 DESI⁺ trioleinu, trilinoleinu a trilinoleninu na HPTLC desce. (a,c,e) Závislost intenzity signálu zvoleného rozsahu m/z na vzdálenosti od počátečního bodu analýzy. (b,d,f) Hmotnostní spektrum v příslušném píku.

5.3.7 Porovnání vhodnosti povrchů na základě absolutních hodnot intenzit signálů při DESI⁺ analýze triacylglycerolů

Jednou z možností, jak porovnat vhodnost různých povrchů pro analýzu, je srovnání nejvyšších změřených absolutních hodnot signálů stejných analytů na různých površích.

Tab. 5.19 Nejvyšší změřené absolutní hodnoty signálu daného analytu na daném povrchu v arbitrárních jednotkách.

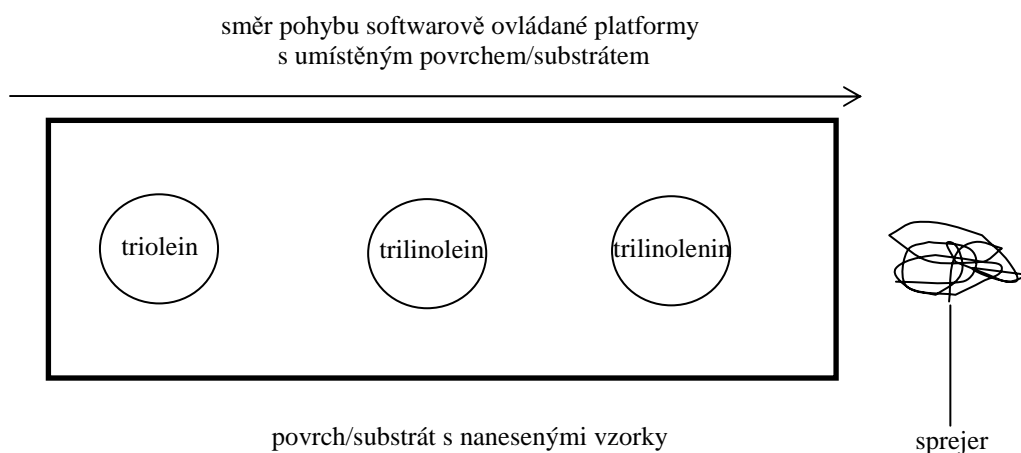
analyt	m/z	intenzita signálu [AU]				
		Teflonová deska	Teflonová fólie	plexisklo	TLC deska	HPTLC deska
triolein	902,0-903,0	$1,8 \cdot 10^4$	$8,8 \cdot 10^3$	$7,0 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^4$
trilinolein	896,0-897,0	$1,6 \cdot 10^4$	$3,7 \cdot 10^3$	$3,6 \cdot 10^3$	$2,7 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^4$

trilinolenin	890,0- 891,0	$5,8 \cdot 10^3$	$6,7 \cdot 10^2$	$9,8 \cdot 10^2$	$8,0 \cdot 10^2$	$6,9 \cdot 10^3$
--------------	-----------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------

Tab. 5.19 ukazuje, že na základě porovnání nejvyšších změřených absolutních hodnot signálů se Teflonová deska a HPTLC deska pro DESI⁺ analýzu triacylglycerolů podél linie jeví jako nejvhodnější povrchy. Zbývající povrchy ukazují srovnatelné výsledky.

5.3.8 DAPPI⁺ na Teflonové desce

Studovanými látkami byly trilinolenin, trilinolein a triolein. Nejvyšší intenzitu signálu poskytoval trilinolein, nejnižší trilinolenin. Experiment probíhal v režimu analýzy podél linie a rychlost pohybu Teflonové desky byla 0,2 mm·s⁻¹. Používanou sprejovací kapalinou byl CH₃COCH₃. Analyzované triacylglyceroly poskytovaly výrazný signál [M+NH₄]⁺.



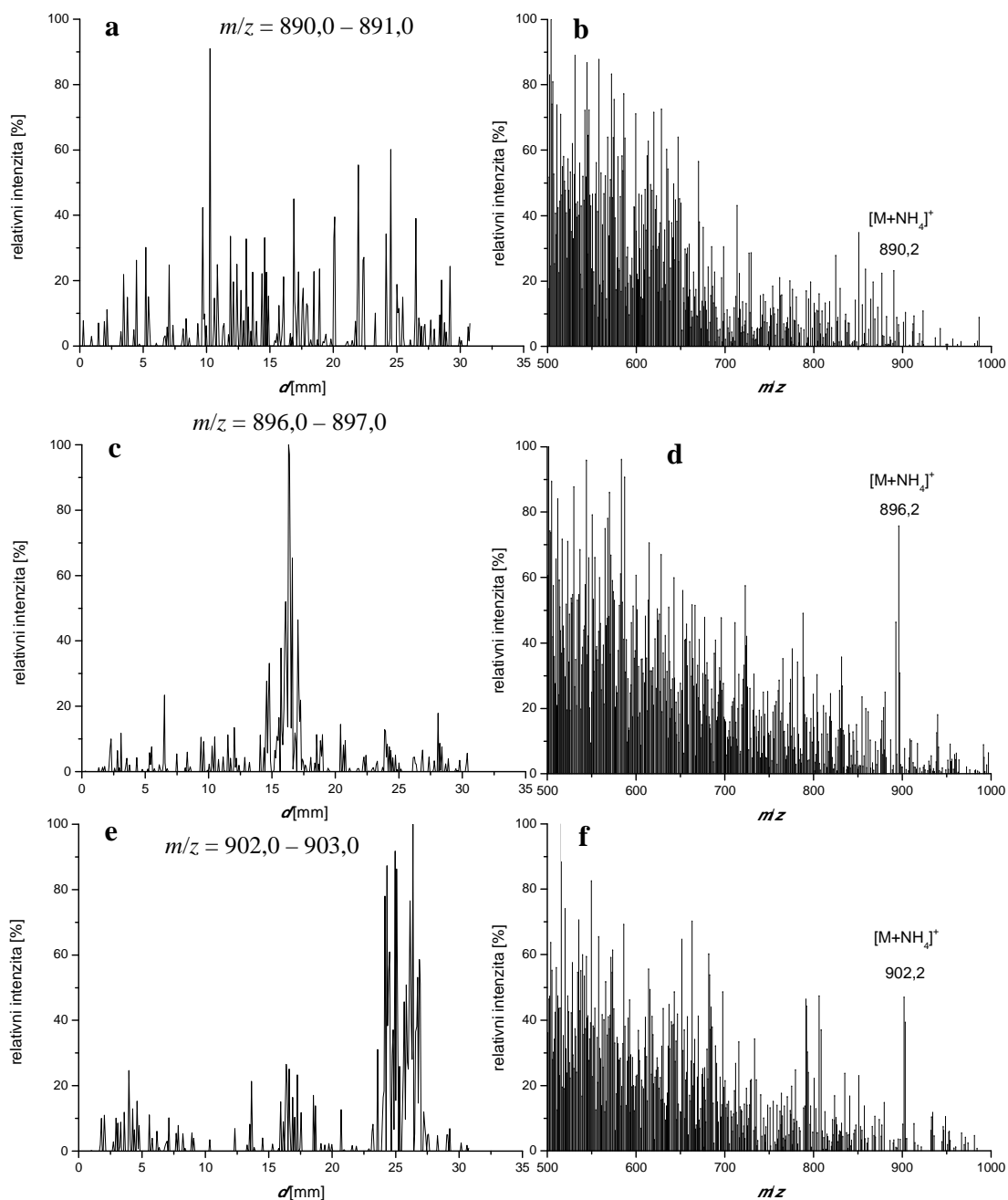
Obr. 5.24 Schéma experimentálního uspořádání DAPPI⁺ trilinoleninu, trilinoleinu a trioleinu na Teflonové desce.

Tab. 5.20 Experimentální podmínky DAPPI⁺ trilinoleninu, trilinoleinu a trioleinu na Teflonové desce.

experimentální parametr	hodnota
ambientní ionizační technika	DAPPI
ionizační mód	pozitivní
d_1	3 mm
d_2	1 mm
d_3	5 mm
α	40 °
sprejovací kapalina	CH ₃ COCH ₃
průtok sprejovací kapaliny	9,90 μl·min ⁻¹

rychlost pohybu Teflonové desky
objem vzorku
koncentrace vzorku

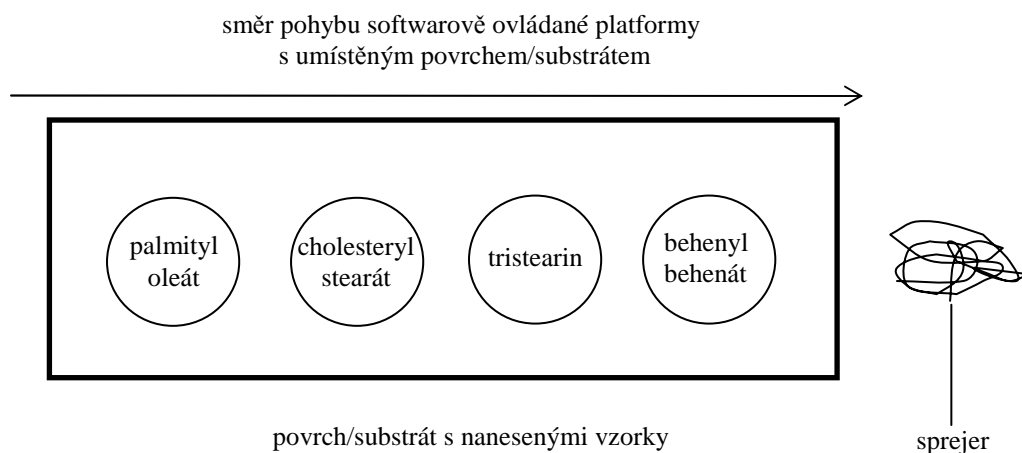
$0,2 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$
 $3 \cdot 1,00 \mu\text{l}$
 $1,00 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$



Obr. 5.25 DAPPI^+ trilinoleninu, trilinoleinu a trioleinu na Teflonové desce. (a,c,e) Závislost intenzity signálu zvoleného rozsahu m/z na vzdálenosti od počátečního bodu analýzy. (b,d,f) Hmotnostní spektrum v příslušném píku.

Studovanými látkami byly behenyl behenát, tristearin, cholesteryl stearát a palmityl oleát. Nejvyšší intenzitu signálu poskytoval palmityl oleát, nejnižší

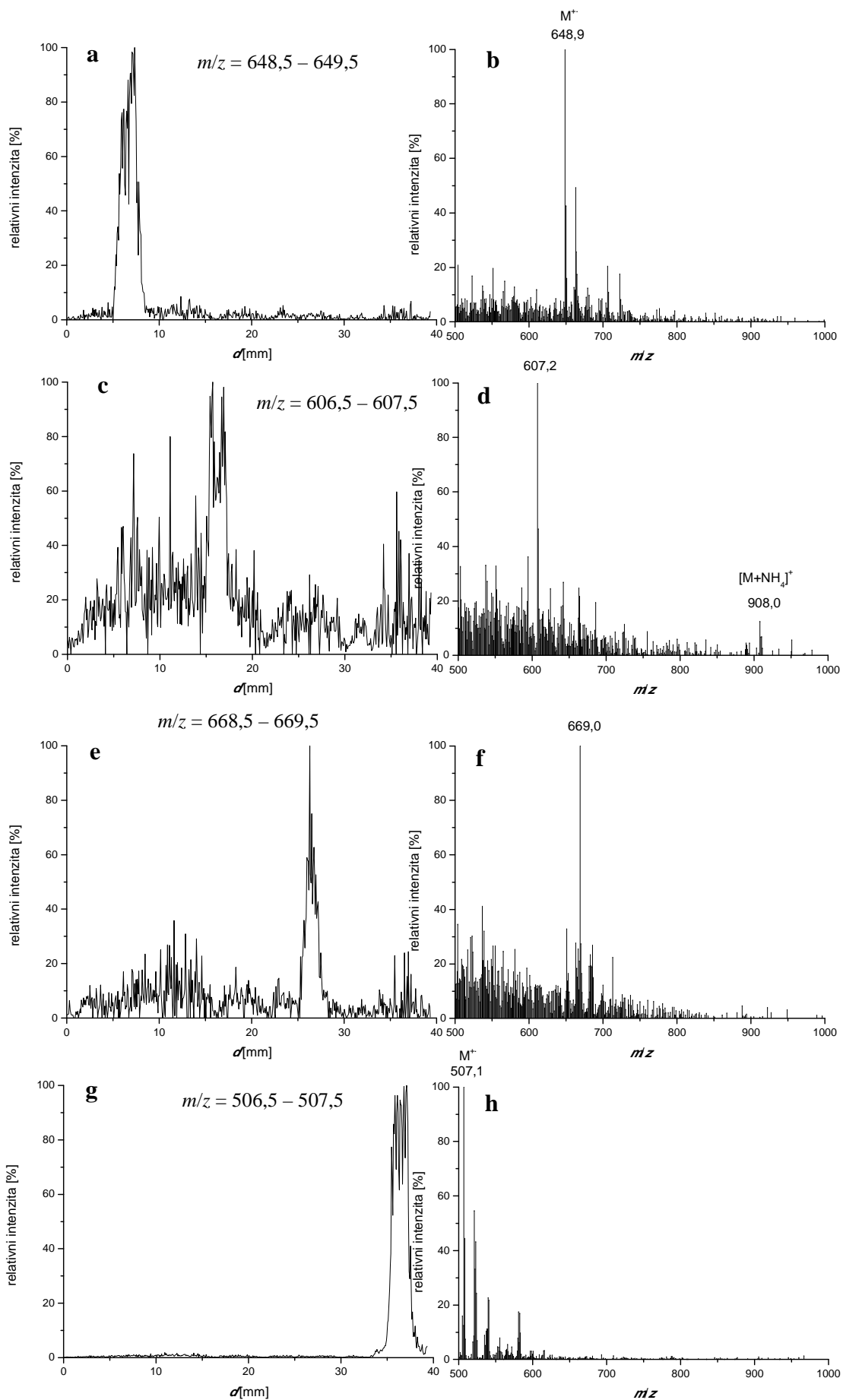
cholesteryl stearát. Experiment probíhal v režimu analýzy podél linie a rychlost pohybu Teflonové desky byla $0,2 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$. Používanou sprejovací kapalinou byl CH_3COCH_3 . Behenyl behenát a palmityl oleát poskytovali výrazný signál M^{+} . Základním píkem ve spektru tristearinu byl fragmentový ion.



Obr. 5.26 Schéma experimentálního uspořádání DAPPI⁺ behenyl behenátu, tristearinu, cholesteryl stearátu a palmityl oleátu na Teflonové desce.

Tab. 5.21 Experimentální podmínky DAPPI⁺ behenyl behenátu, tristearinu, cholesteryl stearátu a palmityl oleátu na Teflonové desce.

experimentální parametr	hodnota
ambientní ionizační technika	DAPPI
ionizační mód	pozitivní
d_1	3 mm
d_2	1 mm
d_3	5 mm
α	40°
sprejovací kapalina	CH_3COCH_3
průtok sprejovací kapaliny	$9,90 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$
rychlost pohybu Teflonové desky	$0,2 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$
objem vzorku	$4 \cdot 1,00 \mu\text{l}$
koncentrace vzorku	$1,00 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$



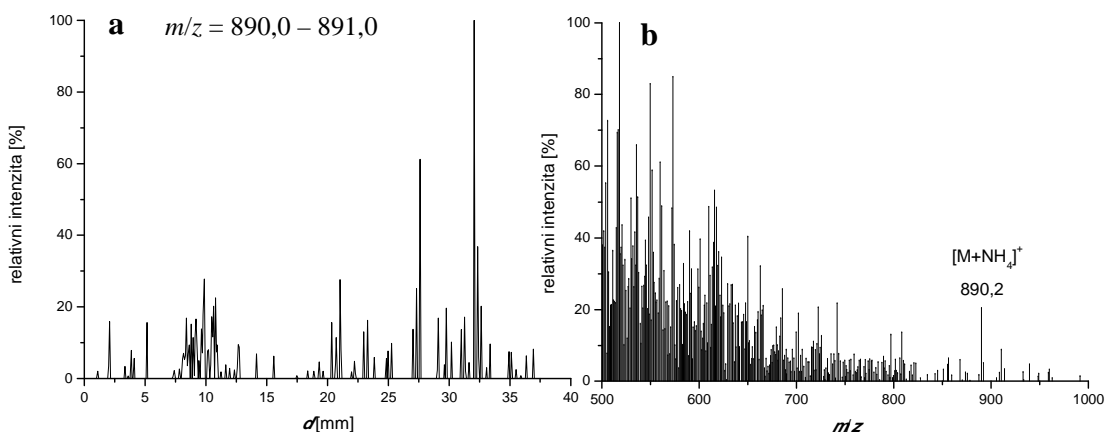
Obr. 5.27 DAPPI⁺ behenyl behenátu, tristearinu, cholesteryl stearátu a palmityl oleátu na Teflonové desce. (a,c,e,g) Závislost intenzity signálu zvoleného rozsahu m/z na vzdálenosti od počátečního bodu analýzy. (b,d,f,h) Hmotnostní spektrum v příslušném píku.

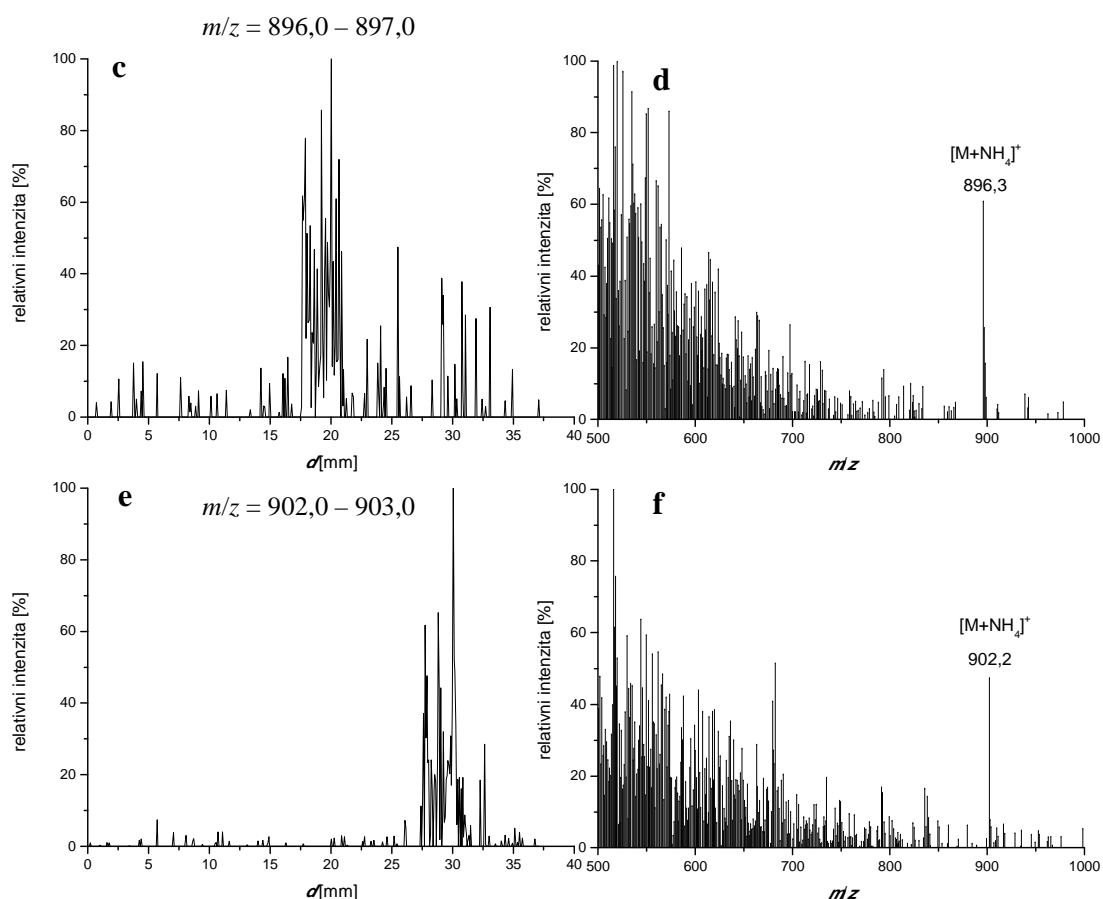
5.3.9 DAPPI⁺ na plexiskle

Studovanými látkami byly trilinolenin, trilinolein a triolein. Nejvyšší intenzitu signálu poskytoval triolein, nejnižší trilinolenin. Experiment probíhal v režimu analýzy podél linie a rychlost pohybu plexiskla byla $0,2 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$. Používanou sprejovací kapalinou byl CH_3COCH_3 . Analyzované triacylglyceroly poskytovaly výrazný signál $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$.

Tab. 5.22 Experimentální podmínky DAPPI⁺ trilinoleninu, trilinoleinu a trioleinu na plexiskle.

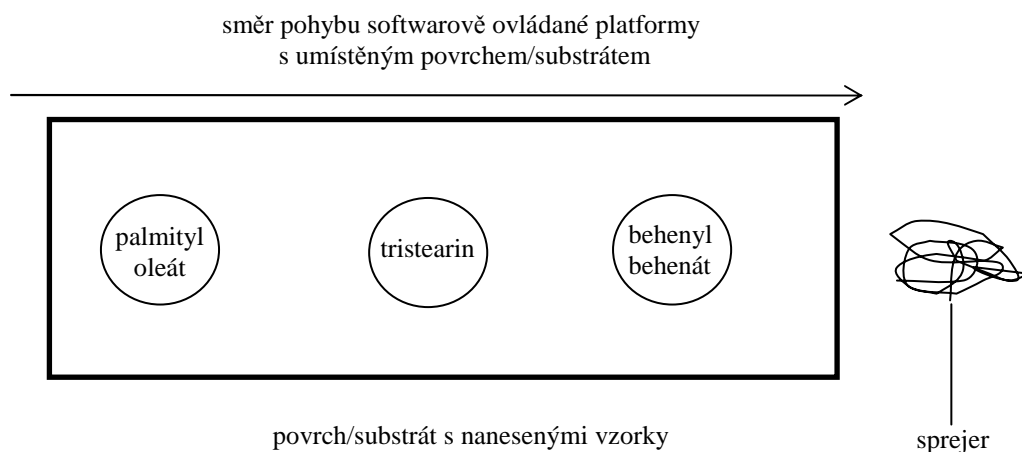
experimentální parametr	hodnota
ambientní ionizační technika	DAPPI
ionizační mód	pozitivní
d_1	3 mm
d_2	1 mm
d_3	5 mm
α	40°
sprejovací kapalina	CH_3COCH_3
průtok sprejovací kapaliny	$9,90 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$
rychlost pohybu plexiskla	$0,2 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$
objem vzorku	$3 \cdot 1,00 \mu\text{l}$
koncentrace vzorku	$1,00 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$





Obr. 5.28 DAPPI⁺ trilinoleninu, trilinoleinu a trioleinu na plexiskle. (a,c,e) Závislost intenzity signálu zvoleného rozsahu m/z na vzdálenosti od počátečního bodu analýzy. (b,d,f) Hmotnostní spektrum v příslušném píku.

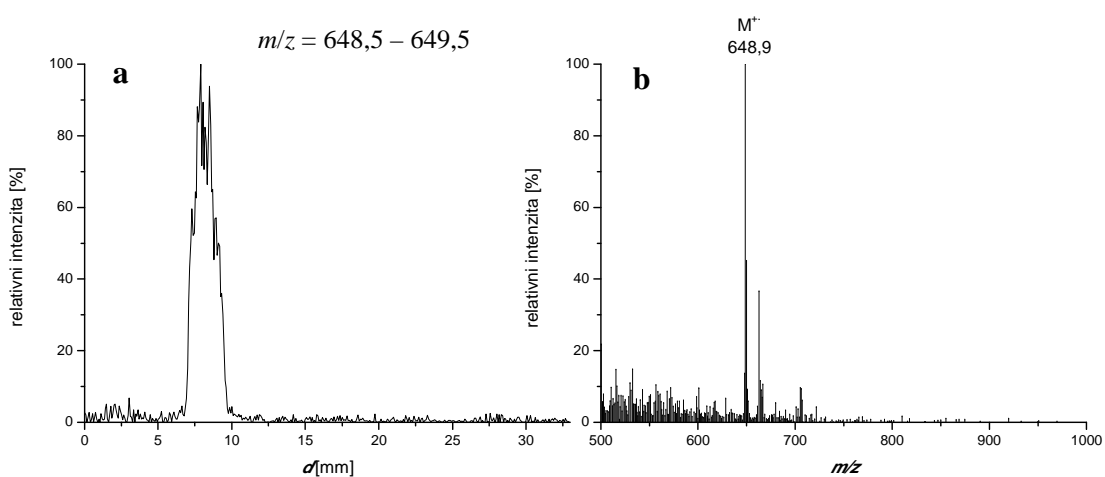
Studovanými látkami byly behenyl behenát, tristearin, a palmityl oleát. Cholesteryl stearát se na plexiskle detekovat nepodařilo. Nejvyšší intenzitu signálu poskytoval palmityl oleát, nejnižší tristearin. Experiment probíhal v režimu analýzy podél linie a rychlost pohybu plexiskla byla $0,2 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$. Používanou sprejovací kapalinou byl CH_3COCH_3 . Behenyl behenát a palmityl oleát poskytovali výrazný signál M^{+} . Základním píkem ve spektru tristearinu byl fragmentový ion.

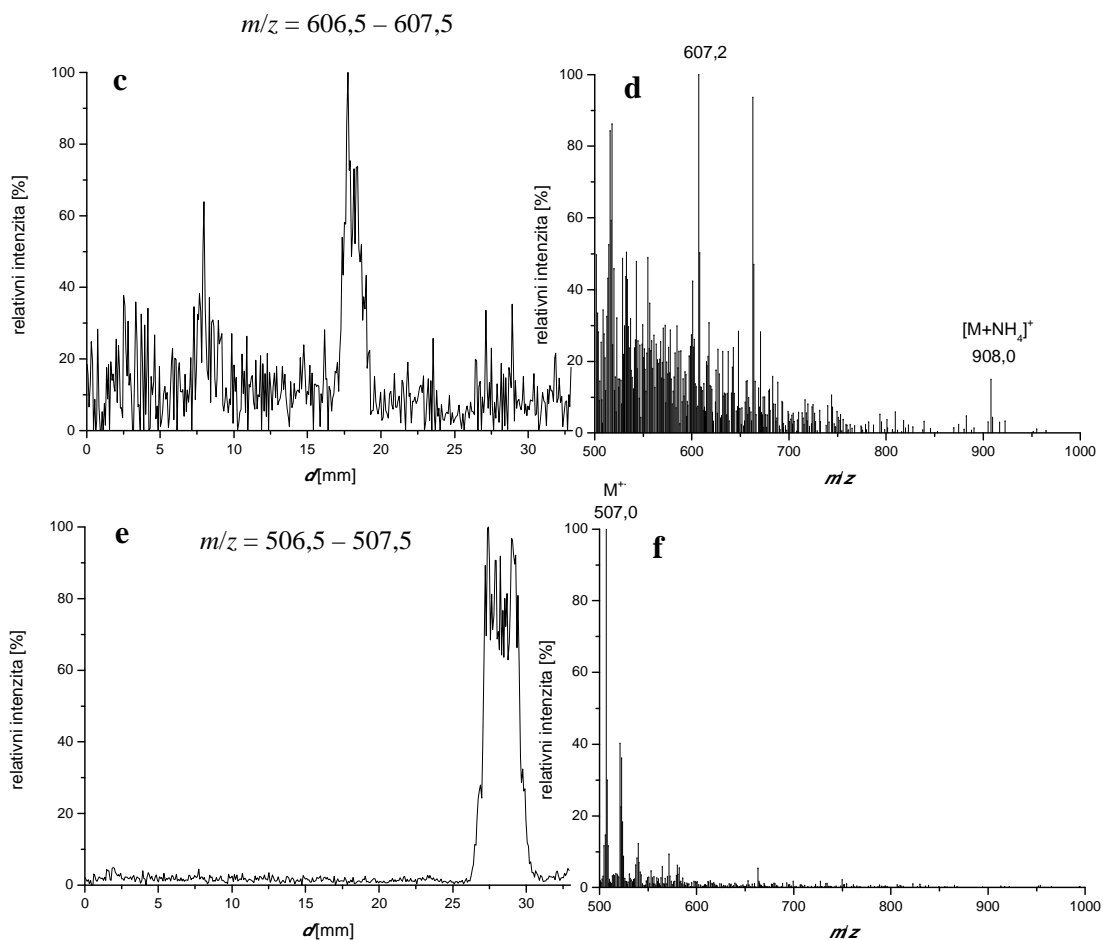


Obr. 5.29 Schéma experimentálního uspořádání DAPPI⁺ behenyl behenátu, tristearinu a palmityl oleátu na plexiskle.

Tab. 5.23 Experimentální podmínky DAPPI⁺ behenyl behenátu, tristearinu a palmityl oleátu na plexiskle.

experimentální parametr	hodnota
ambientní ionizační technika	DAPPI
ionizační mód	pozitivní
d_1	3 mm
d_2	1 mm
d_3	5 mm
α	40 °
sprejovací kapalina	CH ₃ COCH ₃
průtok sprejovací kapaliny	9,90 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
rychlost pohybu plexiskla	0,2 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$
objem vzorku	3 · 1,00 μl
koncentrace vzorku	1,00 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$





Obr. 5.30 DAPI⁺ behenyl behenátu, tristearinu a palmityl oleátu na plexiskle. (a,c,e) Závislost intenzity signálu zvoleného rozsahu m/z na vzdálenosti od počátečního bodu analýzy. (b,d,f) Hmotnostní spektrum v příslušném píku.

5.3.10 Porovnání vhodnosti povrchů na základě absolutních hodnot intenzit signálů při DAPI⁺ analýze triacylglycerolů a voskových esterů

Jednou z možností, jak porovnat vhodnost různých povrchů pro analýzu, je srovnání nejvyšších změřených absolutních hodnot signálů stejných analytů měřených na různých površích.

Tab. 5.24 Nejvyšší změřené absolutní hodnoty signálu daného analytu na daném povrchu v arbitrárních jednotkách.

analyt	m/z	intenzita signálu [AU]	
		Teflonová deska	plexisklo
triolein	902,0–903,0	$3,2 \cdot 10^3$	$4,1 \cdot 10^3$
trilinolein	896,0–897,0	$4,4 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$

trilinolenin	890,0–891,0	$1,9 \cdot 10^3$	$4,0 \cdot 10^2$
behenyl behenát	648,5–649,5	$2,7 \cdot 10^4$	$2,6 \cdot 10^4$
tristearin	606,5–607,5	$6,1 \cdot 10^3$	$3,2 \cdot 10^3$
palmityl oleát	506,5–507,5	$2,0 \cdot 10^5$	$4,3 \cdot 10^4$

Tab. 5.24 ukazuje, že na základě porovnání nejvyšších změřených absolutních hodnot signálů nelze jednoznačně rozhodnout, jestli je pro DAPPI⁺ analýzu triacylglycerolů a voskových esterů podél linie vhodnější Teflonová deska, nebo plexisklo.

5.4 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Tab. 5.25 Experimentální podmínky DESI⁺ Teflonové desky a plexiskla nejprve bez analytů a následně i s analyty pro určení mezí detekce a stanovitelnosti.

experimentální parametr	hodnota
ambientní ionizační technika	DESI
ionizační mód	pozitivní
d_1	3 mm
d_2	1 mm
d_3	5 mm
α	50 °
sprejovací kapalina	CH ₃ OH/H ₂ O/NH ₃ (aq) (50/50/0,1; v/v/v)
průtok sprejovací kapaliny	4,00 $\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$

Tab. 5.26 Experimentální podmínky DESI⁻ Teflonové desky a plexiskla nejprve bez analytů a následně i s analyty pro určení mezí detekce a stanovitelnosti.

experimentální parametr	hodnota
ambientní ionizační technika	DESI
ionizační mód	negativní
d_1	3 mm
d_2	1 mm
d_3	5 mm
α	50 °
sprejovací kapalina	CH ₃ OH/H ₂ O (50/50; v/v)
průtok sprejovací kapaliny	4,00 $\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$

Tab. 5.27 Experimentální podmínky DAPPI⁺ Teflonové desky a plexiskla nejprve bez analytů a následně i s analyty pro určení mezí detekce a stanovitelnosti.

experimentální parametr	hodnota
ambientní ionizační technika	DAPPI
ionizační mód	pozitivní
d_1	3 mm
d_2	1 mm

d_3	5 mm
α	40 °
sprejovací kapalina	CH ₃ COCH ₃
průtok sprejovací kapaliny	10,00 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$

Tab. 5.28 Směrodatné odchylky pro různé analyty a ambientní ionizační techniky na Teflonové desce a plexiskle vypočítané ze souboru 10 měření na čistém povrchu bez analytu (jde tedy o 10 měření tzv. blanku).

analyt	směrodatné odchylky [AU]					
	DESI ⁺		DESI ⁻		DAPPI ⁺	
	Teflonová deska	plexisklo	Teflonová deska	plexisklo	Teflonová deska	plexisklo
PE	91,7	38,7	—	—	—	—
lyso-PC	76,4	42,0	—	—	—	—
SM	52,1	39,2	—	—	—	—
PS	—	—	3,4	3,9	—	—
ST	—	—	3,0	1,7	—	—
PA	—	—	10,1	6,9	—	—
triolein	170	71,0	—	—	32,3	8,0
trilinolein	53,3	34,0	—	—	22,3	9,3
trilinolenin	37,8	44,4	—	—	53,7	19,3
behenyl	—	—	—	—	324	201
behenát	—	—	—	—	—	—
tristearin	—	—	—	—	607	274
palmityl	—	—	—	—	2111	959
oleát	—	—	—	—	—	—

Tab. 5.29 Meze detekce jednotlivých analytů měřených různými ambientními ionizačními technikami na Teflonové desce a plexiskle.

analyt	meze detekce [μg]					
	DESI ⁺		DESI ⁻		DAPPI ⁺	
	Teflonová deska	plexisklo	Teflonová deska	plexisklo	Teflonová deska	plexisklo
PE	8,0	4,0	—	—	—	—
lyso-PC	0,3	1,1	—	—	—	—
SM	2,5	4,0	—	—	—	—
PS	—	—	0,2	0,2	—	—
ST	—	—	0,4	0,2	—	—
PA	—	—	0,5	0,4	—	—
triolein	0,3	0,7	—	—	0,02	0,03
trilinolein	0,1	0,7	—	—	0,03	0,02
trilinolenin	0,2	4,4	—	—	1,6	0,3
behenyl	—	—	—	—	0,4	0,4
behenát	—	—	—	—	—	—
tristearin	—	—	—	—	0,5	0,5
palmityl	—	—	—	—	3,0	0,7
oleát	—	—	—	—	—	—

Tab. 5.30 Meze stanovitelnosti jednotlivých analytů měřených různými ambientními ionizačními technikami na Teflonové desce a plexiskle.

analyt	meze stanovitelnosti [μg]					
	DESI ⁺		DESI ⁻		DAPPI ⁺	
	Teflonová deska	plexisklo	Teflonová deska	plexisklo	Teflonová deska	plexisklo
PE	25	15	–	–	–	–
lyso-PC	0,9	4,5	–	–	–	–
SM	8,5	15	–	–	–	–
PS	–	–	0,4	0,5	–	–
ST	–	–	1,3	0,7	–	–
PA	–	–	1,0	0,8	–	–
triolein	1,1	1,9	–	–	0,1	0,1
trilinolein	0,2	1,8	–	–	0,2	0,1
trilinolenin	0,8	13	–	–	6,0	0,7
behenyl	–	–	–	–	1,4	1,1
behenát	–	–	–	–	–	–
tristearin	–	–	–	–	2,0	1,6
palmityl	–	–	–	–	7,0	2,5
oleát	–	–	–	–	–	–

Porovnáním metod DESI a DAPPI při měření triacylglycerolů bylo dosaženo nižších mezí detekce pro DAPPI. DAPPI se tedy ukázala jako metoda vhodnější pro analýzu nepolárních sloučenin s dlouhými postranními uhlovodíkovými řetězci.

Zjištěné výsledky neposkytují jednoznačnou odpověď na to, jestli je pro ambientní hmotnostní spektrometrii vhodnějším povrchem Teflonová deska, či plexisklo. Pouze v případě DESI⁺ triacylglycerolů lze tvrdit, že se na Teflonové desce dosáhlo nižších mezí detekce než na plexiskle.

Semikvantitavním přístupem určené meze detekce metodami DESI⁺, DESI⁻ a DAPPI⁺ pro vybrané analyty ze tříbodových kalibračních přímků na Teflonové desce a plexiskle se pohybovaly v rozsahu od desítek nanogramů po několik mikrogramů a meze stanovitelnosti v rozsahu od stovek nanogramů po desítky mikrogramů. Při DESI analýze léčiv (nízkomolekulárních sloučenin) z Teflonu⁹⁵ bylo ale pro porovnání dosaženo mezí detekce v rozsahu desítek pikogramů až po stovky nanogramů. Při DESI analýze výbušnin (nízkomolekulárních sloučenin) se meze detekce pohybovaly dokonce v rozsahu desítek femtogramů až stovek pikogramů.⁹⁶

Důvodem vyšších zjištěných mezí detekce a stanovitelnosti může být nízká stabilita signálu způsobená jednak nedokonalým sprejerem, jednak i rozmýváním vzorku po desce.

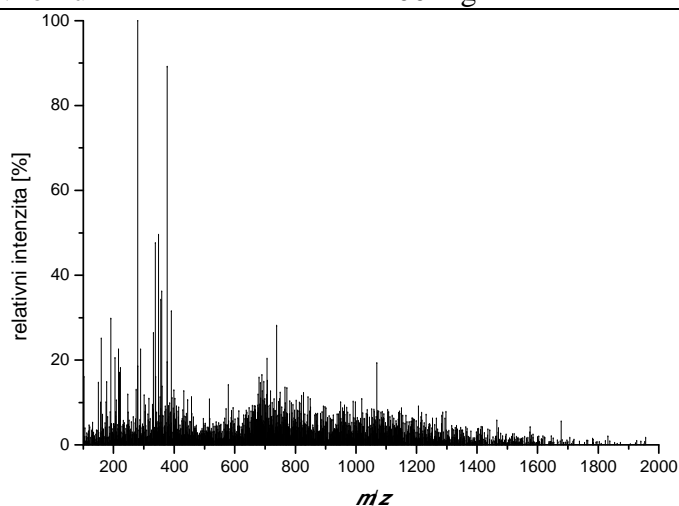
5.5. Analýza novorozeneckého mázku z jednoho bodu a podél linie bez předcházející chromatografické separace

Nejprve byla provedena DESI⁺ analýza, která se v případě mázku surového, i jeho extraktů ukázala jako nevhodná. Mázek je totiž komplexní matricí převážně nepolární povahy. Byla proto provedena DAPPI⁺ analýza, která je k DESI metodou komplementární s účinnější ionizací molekul nepolární povahy, a získaná spektra ukázala, že je to metoda vhodná. DAPPI⁺ bylo možno aplikovat na surový novorozenecký mázek i jeho extrakty. Ze surové formy ale nebyla kvůli interferencím získána spektra s tak jasně oddělenými oblastmi některých skupin organických sloučenin obsažených v mázku jako v případě extraktů.

Režim analýzy z jednoho bodu i podél linie ukazovaly srovnatelné výsledky.

Tab. 5.31 Experimentální podmínky DESI⁺ MTBE celkového lipidového extraktu novorozeneckého mázku na Teflonové desce.

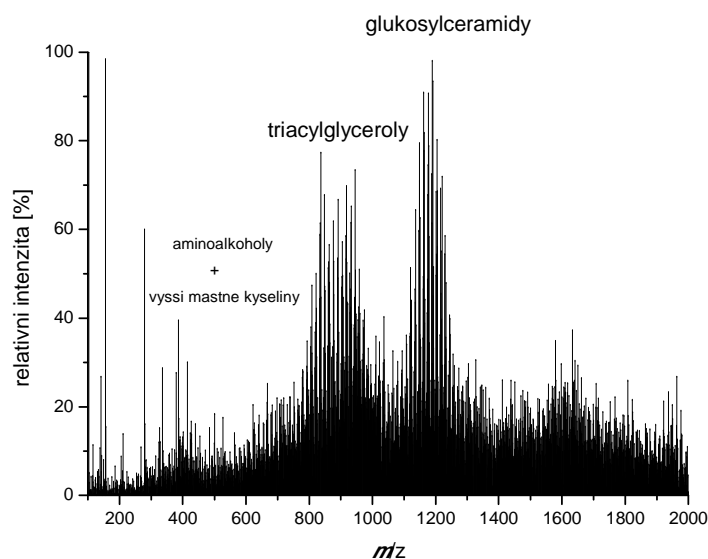
experimentální parametr	hodnota
ambientní ionizační technika	DESI
ionizační mód	pozitivní
d_1	5 mm
d_2	1 mm
d_3	7 mm
α	45 °
sprejovací kapalina	CH ₃ OH/H ₂ O/CH ₃ COOH (90/10/0,1; v/v/v)
průtok sprejovací kapaliny	9,00 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
rychlost pohybu Teflonové desky	0,2 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$
objem vzorku	2 · 10,00 μl
koncentrace vzorku	100 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$



Obr. 5.31 Hmotnostní spektrum z MTBE celkového lipidového extraktu novorozeneckého mázku získaného DESI⁺ na Teflonové desce v režimu analýzy podél linie.

Tab. 5.32 Experimentální podmínky DAPPI⁺ MTBE celkového lipidového extraktu novorozeneckého mázku na Teflonové desce.

experimentální parametr	hodnota
ambientní ionizační technika	DAPPI
ionizační mód	pozitivní
d_1	3 mm
d_2	1 mm
d_3	5 mm
α	40 °
sprejovací kapalina	CH ₃ COCH ₃ /CH ₃ COOH/CH ₃ COONH ₄ (99/0,2/0,8; v/v/v)
průtok sprejovací kapaliny	9,90 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
rychlost pohybu Teflonové desky	0,1 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$
objem vzorku	2 · 10,00 μl
koncentrace vzorku	100 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$



Obr. 5.32 Hmotnostní spektrum z MTBE celkového lipidového extraktu novorozeneckého mázku získaného DAPPI⁺ na Teflonové desce v režimu analýzy podél linie. Lze rozlišit oblasti některých skupin organických sloučenin obsažených ve vzorku.

5.6 HPTLC/DESI-MS

Je známo, že jednoduché lipidy (i některé složené) lze rozdělit chromatografií na tenké vrstvě. Nejběžněji používané mobilní fáze obsahují hexan, diethylether a kyselinu mravenčí (resp. kyselinu octovou) v různém objemovém poměru. Pokusili

jsme se proto nalézt vhodnou mobilní fázi pro úspěšnou separaci modelové směsi vybraných tříd lipidů, následně desku podrobit bez jakékoli úpravy oddělených vzorků ambientní ionizací v režimu analýzy podél linie a detekovat jednotlivé třídy separovaných lipidů.

Tab. 5.33 Analyzované směsi lipidů metodou HPTLC/DESI-MS a podmínky měření.

analyzované lipidy	mobilní fáze pro HPTLC separaci	sprejovací kapalina pro DESI-MS analýzu
trilinolein + palmityl oleát	hexan/diethylether/kyselina mravenčí (80/20/2; v/v/v) [1a]	methanol/chloroform/mravenčan amonný (75/25/1; v/v/v) [1b]
monokaprin + trilinolein	hexan/diethylether/kyselina mravenčí (50/50/2; v/v/v) [2a]	acetonitril [2b]
1,2-dikaprin + trilinolein	hexan/diethylether/kyselina mravenčí (50/50/2; v/v/v)	acetonitril
lyso-PC + monokaprin + 1,2-dikaprin + trilinolein	hexan/diethylether/kyselina mravenčí (50/50/2; v/v/v)	acetonitril/methanol (80/20; v/v) [4b]
lyso-PC + monokaprin + 1,2-dikaprin + 1,3-dikaprin + trilinolein + palmityl oleát	hexan/diethylether/kyselina mravenčí (60/40/2; v/v/v) [5a]	acetonitril/propan-2-ol(80/20; v/v) [5b]

První experimenty byly prováděny s trilinoleinem jako zástupcem triacylglycerolů a palmityl oleátem jako zástupcem voskových esterů. V mobilní fázi [1a] (Tab. 5.33) se analyty oddělily. Sprejovací kapalina [1b] byla použita na základě literatury.⁹⁷

Jako zástupce monoacylglycerolů byl vybrán 1-monokaprin. Pro zvýšení jeho R_F (retardační faktor) tak, aby nezůstal na startu chromatografické desky, bylo nutno použít polárnější mobilní fázi [2a], tedy zvýšit podíl diethyletheru. Sprejovací kapalina [1b] se ukázala být pro ionizaci 1-monokaprinu nevhodná, byla tedy nahrazena [2b]. Nejintenzivnějšími ionty ve spektru 1-monokaprinu byly $[2M + Na]^+$.

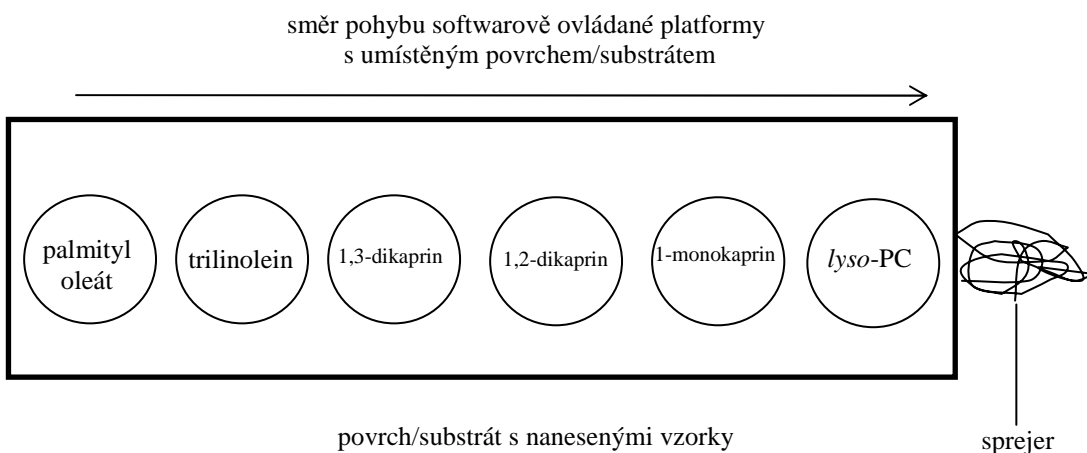
1,2-dikaprin byl vybrán jako zástupce 1,2-diacylglycerolů. V kombinaci s trilinoleinem byl úspěšně analyzován za stejných podmínek jako 1-monokaprin. Nejintenzivnějšími ionty v jeho spektru byly opět $[2M + Na]^+$.

Dalším krokem byla analýza směsi obsahující 1-monokaprin, 1,2-dikaprin a trilinolein, ke kterým byl navíc přidán *lyso*-PC jako zástupce fosfolipidů. Pro ionizaci *lyso*-PC bylo nutno do sprejovací kapaliny přidat methanol.

Posledním krokem bylo přidání 1,3-dikaprinu, jež je konstitučním izomerem 1,2-dikaprinu a má podobné chemické vlastnosti, a palmityl oleátu jako zástupce voskových esterů. Na obr. 5.34e lze vidět, že se tenkovrstvou chromatografií podařilo oba konstituční izomery oddělit. Pro zvýšení rozpustnosti palmityl oleátu byl methanol ve sprejovací kapalině [4b] nahrazen propan-2-olem. Zároveň byla upravena mobilní fáze [2a] na hexan/diethylether/kyselina mravenčí (60/40/2; v/v/v) tak, aby se snížil R_F palmityl oleátu, který by jinak na chromatografické desce postupoval přímo s čelem mobilní fáze.

Tab. 5.34 Složení výsledné směsi lipidů analyzované HPTLC/DESI-MS.

třída lipidů	analyt
fosfolipid	<i>lyso</i> -fosfatidylcholin
monoacylglycerol	1-monokaprin
1,2-diacylglycerol	1,2-dikaprin
1,3-diacylglycerol	1,3-dikaprin
triacylglycerol	trilinolein
voskový ester	palmityl oleát

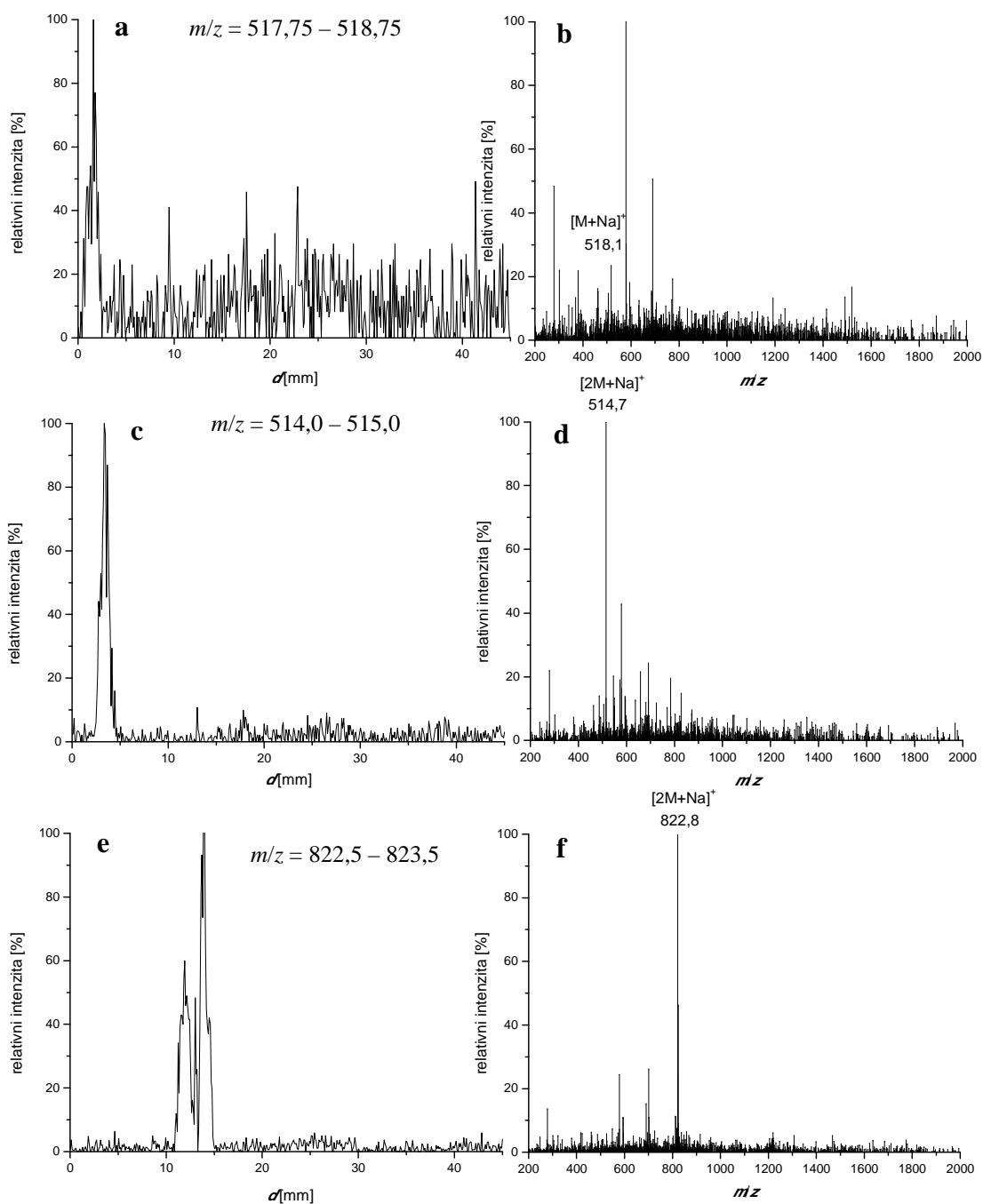


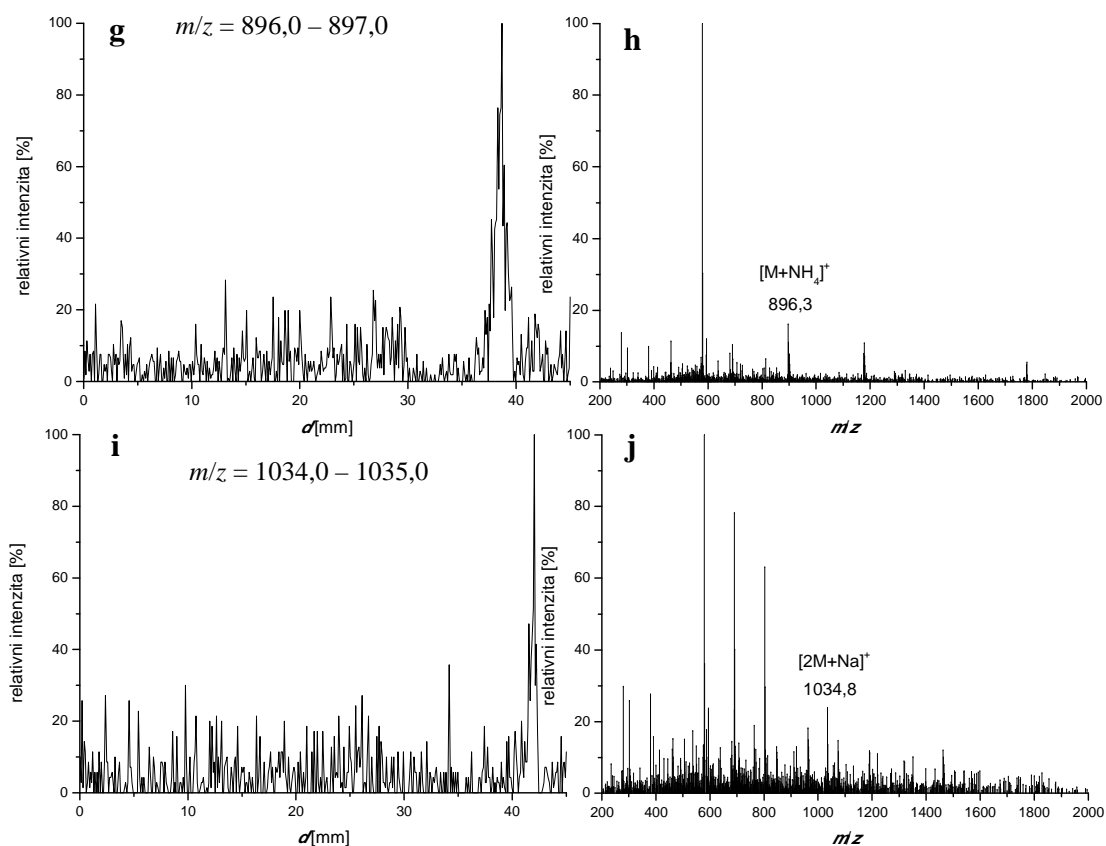
Obr. 5.33 Schéma experimentálního uspořádání DESI⁺ *lyso*-PC, 1-monokaprinu, 1,2-dikaprinu, 1,3-dikaprinu, trilinoleinu a palmityl oleátu po předchozí separaci na HPTLC desce.

Tab. 5.35 Experimentální podmínky DESI⁺ *lyso*-PC, 1-monokaprinu, 1,2-dikaprinu, 1,3-dikaprinu, trilinoleinu a palmityl oleátu po předchozí separaci na HPTLC desce.

experimentální parametr	hodnota
-------------------------	---------

ambientní ionizační technika	DESI
ionizační mód	pozitivní
d_1	2 mm
d_2	1 mm
d_3	3 mm
α	50 °
sprejovací kapalina	CH ₃ CN/propan-2-ol (80/20; v/v)
průtok sprejovací kapaliny	20,0 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
rychlost pohybu HPTLC desky	0,1 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$
objem vzorků	1 · 1,00 μl + 5 · 0,50 μl
koncentrace vzorků	1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$

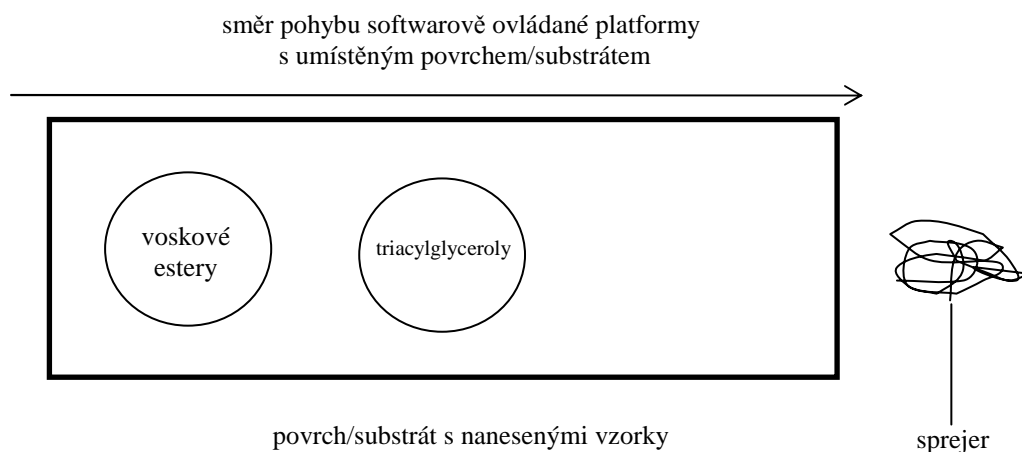




Obr. 5.34 DESI⁺ modelové směsi lipidů složené ze šesti zástupců různých tříd lipidů po předchozí separaci na HPTLC desce. (a,c,e,g,i) Závislost intenzity signálu zvoleného rozsahu m/z na vzdálenosti od počátečního bodu analýzy. (b,d,f,h,j) Hmotnostní spektrum v příslušném píku.

5.7 HPTLC/DAPPI-MS

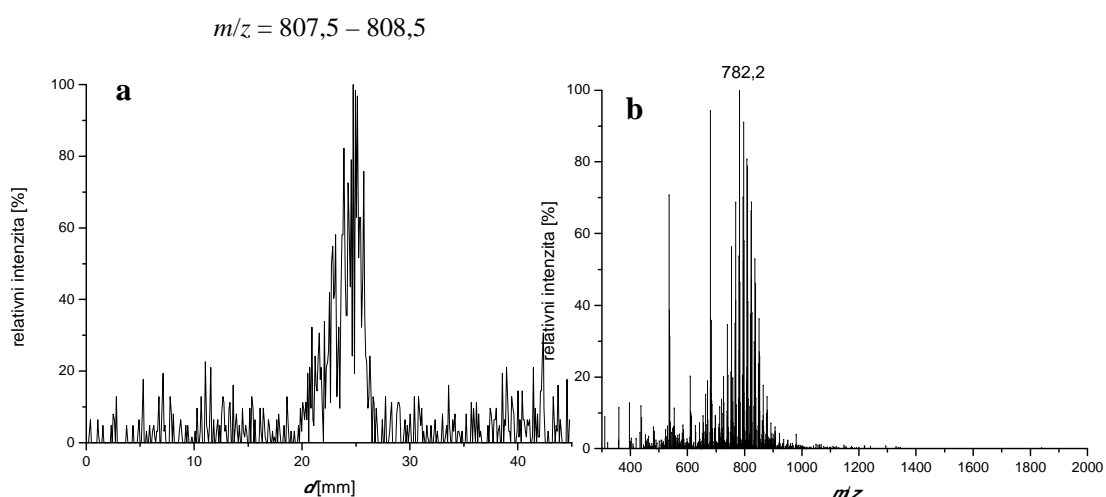
Aplikací spojení HPTLC s ambientní hmotnostní spektrometrií byla analýza novorozeneckého mázku. Je známo, že v lipidové frakci mázku jsou ve velké míře přítomny triacylglyceroly a voskové estery. Pro HPTLC separaci Folch celkového lipidového extraktu mázku o koncentraci $100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ byla použita mobilní fáze hexan/diethylether/kyselina mravenčí (80/20/2; v/v/v).

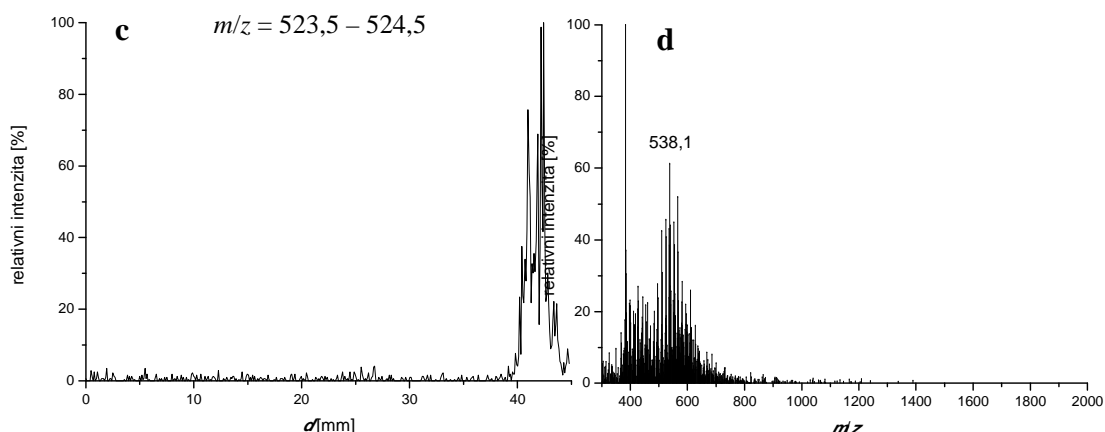


Obr. 5.35 Schéma experimentálního uspořádání DAPPI⁺ Folch celkového lipidového extraktu novorozeneckého mázku po předchozí separaci na HPTLC desce.

Tab. 5.36 Experimentální podmínky DAPPI⁺ Folch celkového lipidového extraktu novorozeneckého mázku po předchozí separaci na HPTLC desce.

experimentální parametr	hodnota
ambientní ionizační technika	DAPPI
ionizační mód	pozitivní
d_1	2 mm
d_2	1 mm
d_3	3 mm
α	50 °
sprejovací kapalina	CH ₃ COCH ₃
průtok sprejovací kapaliny	20,0 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
rychlost pohybu HPTLC desky	0,1 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$
objem vzorku	1,00 μl
koncentrace vzorku	100 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$





Obr. 5.36 DAPPI⁺ Folch celkového lipidového extraktu novorozenecké mázky po předchozí separaci na HPTLC desce. Lze rozdělit a detekovat triacylglyceroly a voskové estery. (a,c) Závislost intenzity signálu zvoleného rozsahu m/z na vzdálenosti od počátečního bodu analýzy. (b,d) Hmotnostní spektrum v příslušném píku.

Obr. 5.36 ukazuje, že triacylglyceroly a voskové estery byly dominantní složkou Folch celkového lipidového extraktu novorozeneckého mázku a že se dostatečně lišily retardačními faktory. Další třídy lipidů, například diestery diolů, se detekovat nepodařilo. Důvodem může být jejich minoritní zastoupení.

5.8 Analýza termitů rodu *Prorhinotermes* (Isoptera, Rhinotermitidae)

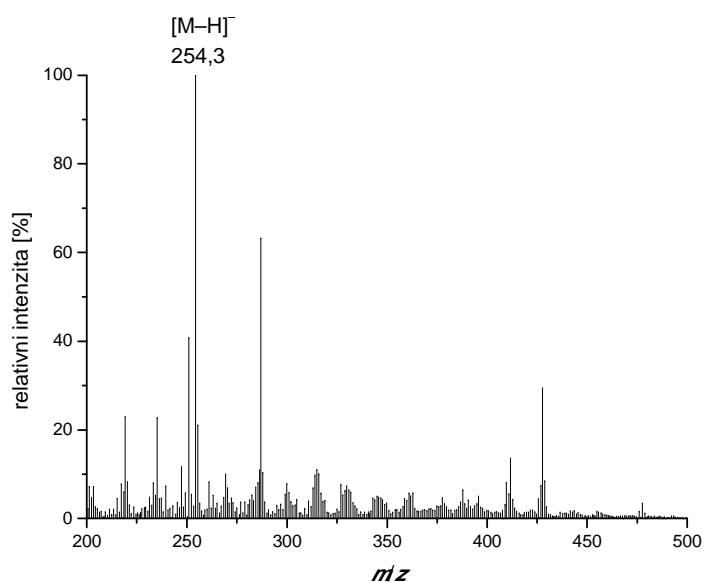
Aplikací ambientní hmotnostní spektrometrie byla i analýza hmyzu. Nitropentadecen (přesněji *trans*-1-nitropentadec-1-en) je vysoce toxický nenasycený nitroalken, který je biosyntetizován některými druhy termitů.^{98,99,100} Vojáci termitů rodu *Prorhinotermes* jej vylučují jako obrannou látku při ohrožení.

Termit voják a termít dělník rodu *Prorhinotermes* byly usmrceni ochlazením na nízkou teplotu, upevnění korekční tekutinou na skleněnou desku a následně podrobeni DAPPI-MS analýze podél linie. Pro analýzu byl snížen příkon externího ohřívání mikročipu z 4,5 W na 1,2 W tak, aby nedocházelo k okamžitému tepelnému rozkladu termita. Výsledná spektra ukázala přítomnost nitropentadecenu na těle termita vojáka, zatímco na těle termita dělníka nikoliv.¹⁰⁰

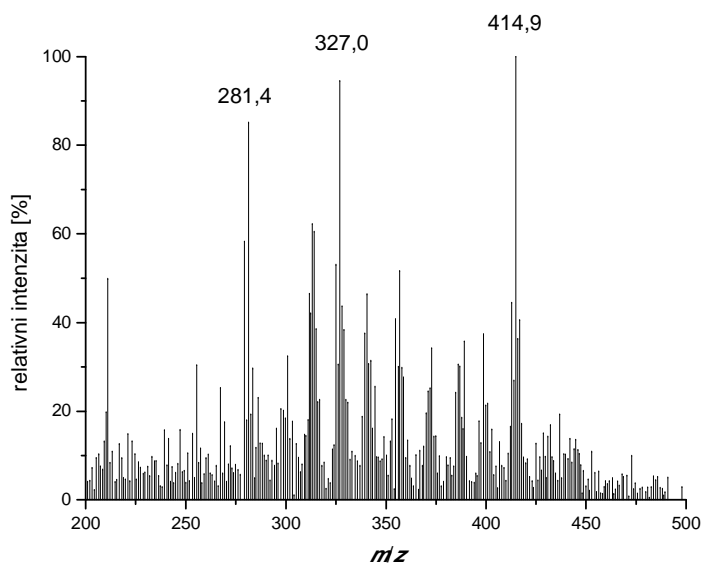
Tab. 5.37 Experimentální podmínky DAPPI⁺ termita vojáka a termita dělníka rodu *Prorhinotermes*.

experimentální parametr	hodnota
ambientní ionizační technika	DAPPI
ionizační mód	negativní

d_1	5 mm
d_2	1 mm
d_3	7 mm
α	45 °
sprejovací kapalina	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$
průtok sprejovací kapaliny	$10,0 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$
rychlost pohybu skleněné desky	$0,1 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$
objem vzorku	—
koncentrace vzorku	—



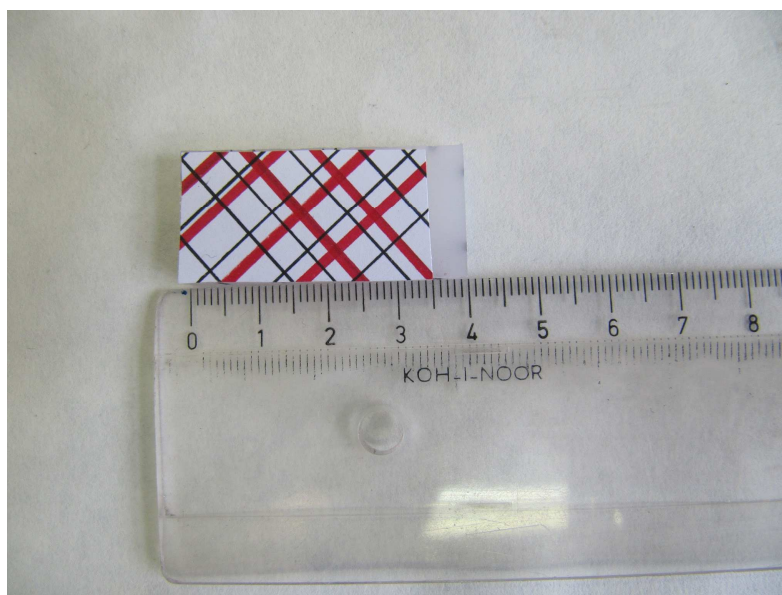
Obr. 5.37 Hmotnostní spektrum DAPPI⁻ termita vojáka rodu *Prorhinotermes*. Základní pík je nitropentadecen, obranná látka syntetizována hmyzím organismem.



Obr. 5.38 Hmotnostní spektrum DAPPI⁻ termita dělníka rodu *Prorhinotermes*. Nitropentadecen nebyl detekován.

5.9 Analýza plochy

Zkoumaným objektem pro pilotní testování analýzy plochy a zobrazovací hmotnostní spektrometrie byl filtrační papír, na němž byla červeným fixem Sharpie® twin tip, Sanford corporatin (Oak Brook, USA) a černým fixem edding 140 S, edding International GmbH (Ahrensburg, Německo) nakreslena pravoúhlá síť (obr.). Červený fix obsahoval jako dominantní složku rhodamin B. Černý fix obsahoval jako dominantní složku neznámou sloučeninu o monoizotopické hmotnosti = 409,5 u. Použitou metodou byla DAPPI⁺.

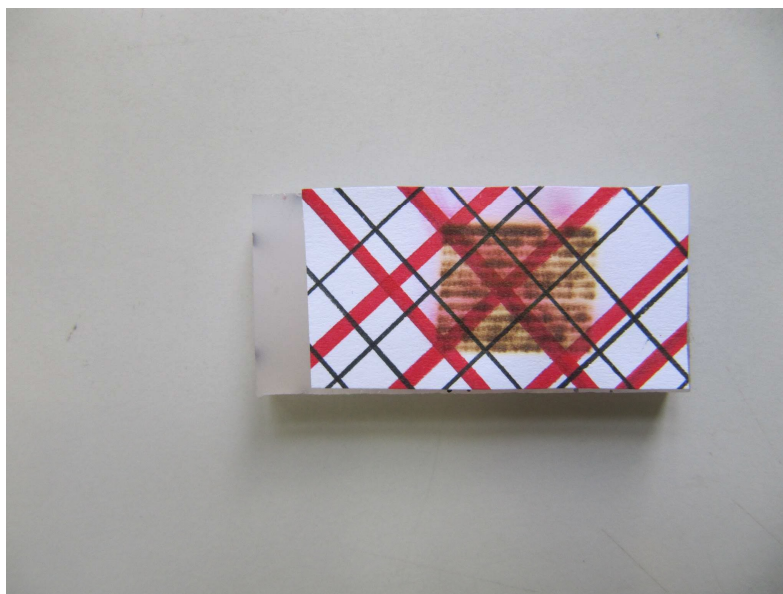


Obr. 5.39 Fotografie analyzované pravoúhlé sítě namalované červeným a černým fixem na filtračním papíru.

Tab. 5.38 Experimentální podmínky DAPPI⁺ pravoúhlé sítě namalované červeným a černým fixem na filtračním papíru.

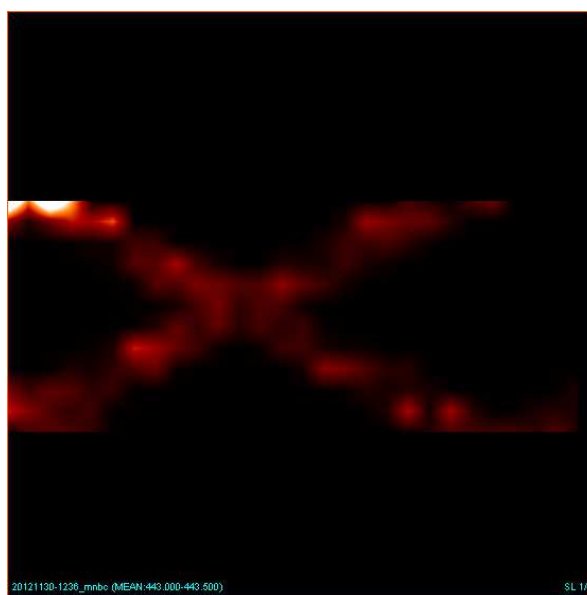
experimentální parametr	hodnota
ambientní ionizační technika	DAPPI
ionizační mód	pozitivní
d_1	2 mm
d_2	1 mm
d_3	3 mm
α	50 °
sprejovací kapalina	$C_6H_5CH_3$
průtok sprejovací kapaliny	$10,0 \mu l \cdot min^{-1}$
čas sběru dat z jedné pozice	6 s
vzdálenost mezi pozicemi v ose x	0,5 mm
vzdálenost mezi pozicemi v ose y	1 mm
celkový rozměr analyzované plochy	14 mm x 12 mm

Aplikovaná směs par rozpouštědla a zmlžovacího plynu o vysoké teplotě poškodila analyzovanou plochu filtračního papíru (obr.).

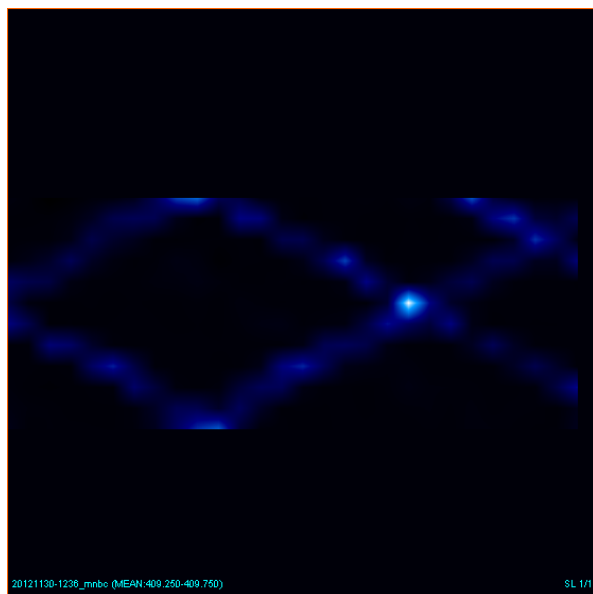


Obr. 5.40 Filtrační papír poškozený směsí par rozpouštědla a zmlžovacího plynu o vysoké teplotě během DAPPI analýzy.

Výsledkem analýzy plochy byl soubor mnoha dat, která byla následně konvertována programem imzML 2D builder for BioMap do jednoho souboru, jenž byl otevřen v programu BioMap, kde byly vytvořeny výsledné obrázky znázorňující červenou barvou prostorovou distribuci sloučenin o $m/z = 443,00\text{--}443,50$ (Obr. 5.41) a modrou barvou prostorovou distribuci sloučenin o $m/z = 409,25\text{--}409,75$ (Obr.5.42).



Obr. 5.41 Obrázek znázorňující červenou barvou prostorovou distribuci sloučenin o $m/z = 443,00\text{--}443,50$ na filtračním papíru.



Obr. 5.42 Obrázek znázorňující modrou barvou prostorovou distribuci sloučenin o $m/z = 409,25$ – $409,75$ na filtračním papíru.

6. Závěr

Byly nalezeny podmínky pro použití ambientních ionizačních technik DESI a DAPPI na analýzu fosfolipidů, triacylglycerolů, voskových esterů a několika dalších nízkomolekulárních sloučenin z polymerních povrchů, skla, TLC a HPTLC desek. Bylo zjištěno, že pro analýzu z TLC a HPTLC desek je nezbytné použít vyšších průtoků sprejovací kapaliny, protože afinita analytů k těmto povrchům je mnohem vyšší než v ostatních zkoumaných případech. Povrchy byly porovnány na základě nejvyšších změřených absolutních hodnot signálů. Semikvantitavním přístupem určené meze detekce metodami DESI^+ , DESI^- a DAPPI^+ pro vybrané analyty ze tříbodových kalibračních přímků na Teflonové desce a plexiskle se pohybovaly v rozsahu od desítek nanogramů po několik mikrogramů a meze stanovitelnosti v rozsahu od stovek nanogramů po desítky mikrogramů.

Ambientní hmotnostní spektrometrie byla využita pro analýzu směsí látek po předchozí HPTLC separaci. Metodou HPTLC/DESI-MS se nejprve podařilo rozdělit směs šesti zástupců různých tříd lipidů a následně je detekovat ambientní hmotnostně-spektrometrickou analýzou bez jakékoliv úpravy HPTLC desky. Bylo tedy experimentálně provedeno HPTLC/MS přímé vzorkování s ambientní ionizací. Další aplikací byla analýza novorozeneckého mázku a to jednak způsobem analýzy z jednoho bodu, ale i HPTLC/DAPPI-MS analýzou, při které byl celkový extrakt novorozeneckého mázku nejprve rozdělen na frakci triacylglycerolů a voskových esterů, jež byly následně detekovány ambientní hmotnostně-spektrometrickou analýzou.

DAPPI-MS bylo použito pro analýzu chemických látek produkovaných termity rodu *Prorehinotermes*. U vojáka byla potvrzena přítomnost nitropentadecenu, obranné toxické látky, zatímco u dělníka tato látka nalezena nebyla.

Byly provedeny pilotní experimenty analýzy vzorku pomocí zobrazovací hmotnostní spektrometrie. Zkoumaným objektem byl filtrační papír, na němž byla červeným a černým fixem nakreslena pravoúhlá síť.

Ambientní ionizační techniky DESI i DAPPI se ukázaly jako výborné nástroje pro rychlou kvalitativní analýzu jak kapalných, tak i pevných vzorků z různých povrchů. Zvláště provedené spojení chromatografie na tenké vrstvě a ambientní ionizace, představující rychlou a selektivní detekci separovaných látek, je

užitečnou aplikací. Analýza biologických objektů i zobrazovací hmotnostní spektrometrie ukázala další možný vývoj a použití těchto technik.

Pro kvantitativní analýzu se použití DESI a DAPPI neukázalo příliš vhodné. Nestabilita signálu, nízká opakovatelnost a reprodukovatelnost byly hlavními příčinami vyšších hodnot zjištěných mezí detekce a stanovitelnosti.

Literatura

1. Ifa, D. R.; Wu, C.; Ouyang, Z.; Cooks, R. G. *Analyst* **2010**, *135*, 669–681.
2. Weston, D. J. *Analyst* **2010**, *135*, 661–668.
3. Yamashita, M.; Fenn, J. B. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 4451–4459.
4. Creaser, C. S.; Ratcliffe, L. *Curr. Anal. Chem.* **2006**, *2*, 9–15.
5. Takats, Z.; Wiseman, J. M.; Gologan, B.; Cooks, R. G. *Science* **2004**, *306*, 471–473.
6. Haapala, M.; Pol, J.; Saarela, V.; Arvola, V.; Kotiaho, T.; Ketola, R. A.; Franssila, S.; Kauppila, T. J.; Kostianen, R. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 7867–7872.
7. Cooks, R. G.; Ouyang, Z.; Takats, Z.; Wiseman, J. M. *Science* **2006**, *311*, 1566–1570.
8. Haapala, M.; Pol, J.; Saarela, V.; Arvola, V.; Kotiaho, T.; Ketola, R. A.; Franssila, S.; Kauppila, T.; Kostianen, R. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 7867–7872.
9. Christie, W. W. *Lipid Analysis* 3th ed. Bridgwater, Velká Británie, The Oily Press **2003**.
10. Hoath, S. B.; Maibach, H. I. *Neonatal Skin: Structure and Function* New York, USA, Marcel Dekker **2003**.
11. Cardé, R. T.; Millar, J. G. *Advances in Insect Chemical Ecology* Reissue edition Cambridge, Velká Británie, Cambridge University Press **2011**.
12. Valentine, S. J.; Plasencia, M. D.; Liu, X.; Krishnan, M.; Naylor, S.; Udseth, H. R.; Smith, R. D.; Clemmer, D. E. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 2977–2984.
13. Chen, H.; Pan, Z.; Talaty, N.; Raftery, D.; Cooks, R. G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 1577–1584.
14. Ouyang, Z.; Cooks, R. G. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2009**, *2*, 187–214.
15. Eberlin, L. S.; Dill, A. L.; Golby, A. J.; Ligon, K. L.; Wiseman, J. M.; Cooks, R. G.; Agar, N. Y. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5953–5956.
16. Harris, G. A.; Galhena, A. S.; Fernández, F. M. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 4508–4538.
17. Cody, R. B.; Laramée, J. A.; Durst, H. D. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 2297–2302.
18. McEwen, C. N.; McKay, R. G.; Larsen, B. S. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *77*, 7826–7831.

19. Williams, J. P.; Patel, V. J.; Holland, R.; Scrivens, J. H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 1447–1456.
20. Haddad, R.; Sparrapan, R.; Eberlin, M. N. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 2901–2905.
21. Chen, H.; Venter, A.; Cooks, R. G. *Chem. Commun.* **2006**, *19*, 2042–2044.
22. Huang, M. Z.; Hsu, H. J.; Lee, J. Y.; Jeng, J.; Shiea, J. J. *Proteome Res.* **2006**, *5*, 1107–1116.
23. Sampson, J. S.; Hawkridge, A. M.; Muddiman, D. C. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2006**, *17*, 1712–1716.
24. Chen, H.; Yang, S.; Wortmann, A.; Zenobi, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7591–7594.
25. Ratcliffe, L. V.; Rutten, F. J. M.; Barrett, D. A.; Whitmore, T.; Seymour, D.; Greenwood, C.; Aranda-Gonzalvo, Y.; Robinson, S.; McCoustra, M. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 6094–6101.
26. Sonnenfeld, A.; Tun, T. M.; Zajíčková, L.; Kozlov, K. V.; Wagner, H. E.; Behnke, J. F.; Hippler, R. *Plasma Process. Polym.* **2001**, *6*, 237–266.
27. Haddad, R.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T.; Eberlin, M. N. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 898–903.
28. Andrade, F. J.; Shelley, J. T.; Wetzol, W. C.; Webb, M. R.; Gamez, G.; Ray, S. J.; Hieftje, G. M. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 2654–2663.
29. Takats, Z.; Nanita, S. C.; Cooks, R. G.; Schlosser, G.; Karoly Vekey, K. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1514–1523.
30. Cody, R. B. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 1101–1107.
31. Wang, H.; Liu, J.; Cooks, R. G.; Ouyang, Z. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 877–880.
32. Venter, A.; Nefliu, M.; Cooks, R. G. *Trends Anal. Chem.* **2008**, *27*, 284–290.
33. Alberici, R. M.; Simas, R. C.; Sanvido, G. B.; Romao, W.; Lalli, P. M.; Benassi, M.; Cunha, I. B. S.; Eberlin, M. N. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 265–294.
34. Wu, C.; Qian, K.; Nefliu, M.; Cooks, R. G. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21*, 261–267.
35. Venter, A.; Sojka, P. E.; Cooks, R. G. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 8549–8555.
36. Costa, A. B.; Cooks, R. G. *Chem. Phys. Lett.* **2008**, *464*, 1–8.

37. Shin, Y. S.; Drolet, B.; Mayer, R.; Dolence, K.; Basile, F. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 3514–3518.
38. Volny, M.; Venter, A.; Smith, S. A.; Pazzi, M.; Cooks, R. G. *Analyst* **2008**, *133*, 525–531.
39. Ifa, D. R.; Rusine, A. L.; Cooks, R. G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 503–510.
40. Weston, D. J.; Bateman, R.; Wilson, I. D.; Wood, T. R.; Creaser, C. S. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 7572–7580.
41. Cotte-Rodriguez, I.; Hernandez-Soto, H.; Chen, H.; Cooks, R. G. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1512–1519.
42. Ifa, D. R.; Wiseman, J. M.; Song, Q.; Cooks, R. G. *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**, *259*, 8–15.
43. Ifa, D. R.; Gumaelius, L. M.; Eberlin, L. S.; Manicke, N. E.; Cooks, R. G. *Analyst* **2007**, *132*, 461–467.
44. Fernandez, F. M.; Cody, R. B.; Green, M. D.; Hampton, C. Y.; McGready, R.; Sengaloundeth, S.; White, N. J.; Newton, P. N. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 702–705.
45. Kauppila, T. J.; Talaty, N.; Salo, P. K.; Kotiaho, T.; Kostianen, R.; Cooks, R. G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 2143–2150.
46. D’Agostino, P. A.; Chenier, C. L.; Hancock, J. R.; Lepage, C. R. J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 543–549.
47. Yang, S.; Han, J.; Huan, Y.; Cui, Y.; Zhang, X.; Chen, H.; Gu, H. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 6070–6079.
48. Pasilis, S. P.; Kertesz, V.; Van Berkel, G. J.; Schulz, M.; Schorcht, S. *J. Mass Spectrom.* **2008**, *43*, 1627–1635.
49. Shin, Y. S.; Drolet, B.; Mayer, R.; Dolence, K.; Basile, F. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 3514–3518.
50. Van Berkel, G. J.; Ford, M. J.; Deibel, M. A. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1207–1215.
51. Jackson, A. U.; Tata, A.; Wu, C.; Perry, R. H.; Haas, G.; West, L.; Cooks, R. G. *Analyst* **2009**, *134*, 867–874.
52. Talaty, N.; Takats, Z.; Cooks, R. G. *Analyst* **2005**, *130*, 1624–1633.
53. Miao, Z.; Chen, H. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20*, 10–19.
54. Song, Y.; Talaty, N.; Datsenko, K.; Wanner, B. L.; Cooks, R. G. *Analyst* **2009**, *134*, 838–841.

55. Li, M.; Chen, H.; Yang, X.; Chen, J.; Li, C. *Atmos. Environ.* **2009**, *43*, 2717–2720.
56. Jackson, A. T.; Williams, J. P.; Scrivens, J. H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 2717–2727.
57. Wu, C.; Ifa, D. R.; Manicke, N. E.; Cooks, R. G. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 7618–7624.
58. Benassi, M.; Wu, C.; Nefliu, M.; Ifa, D. R.; Volny, M.; Cooks, R. G. *Int. J. Mass Spectrom.* **2009**, *280*, 235–240.
59. Chen, H. W.; Wortmann, A.; Zhang, W. H.; Zenobi, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 580–583.
60. Law, W. S.; Chen, H.; Ding, J.; Yang, S.; Zhu, Y.; Gamez, G.; Chingin, K.; Ren, Y.; Zenobi, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1–5.
61. Ostman, P.; Martilla, S. J.; Kotiaho, T.; Franssila, S.; Kostiainen, R. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6659–6664.
62. Syage, J. A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15*, 1521–1533.
63. Robb, D. B.; Covey, T. R.; Bruins, A. P. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3653–3659.
64. Luosujarvi, L.; Arvola, V.; Haapala, M.; Pol, J.; Saarela, V.; Franssila, S.; Kotiaho, T.; Kostiainen, R.; Kaupilla, T. J. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 7460–7466.
65. Pasilis, S. P.; Kertesz, V.; Van Berkel, G. J. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1208–1214.
66. Luosujarvi, L.; Kanerva, S.; Saarela, V.; Franssila, S.; Kostiainen, R.; Kotiaho, T.; Kaupilla, T. J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 1343–1350.
67. Luosujarvi, L.; Laakkonen, U. M.; Kostiainen, R.; Kotiaho, T.; Kaupilla, T. J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 1401–1404.
68. Jones, R. W.; Cody, R. B.; McClelland, J. F. *J. Forensic Sci.* **2006**, *51*, 915–918.
69. Fernandez, F. M.; Cody, R. B.; Green, M. D.; Hampton, C. Y.; McGready, R.; Sengaloundeth, S.; White, N. J.; Newton, P. N. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 702–705.
70. Haefliger, O. P.; Jeckelman, N. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 1361–1366.
71. Yu, S.; Crawford, E.; Tice, J.; Musselman, B.; Wu, J. T. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 193–202.
72. Siouffi, A.-M. *Sep. Purif. Rev.* **2005**, *34*, 155–180.
73. Sherma, J. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 4253–4267.
74. Morlock, G.; Schwack, W. *Trends Anal. Chem.* **2010**, *29*, 1157–1171.

75. Ghosh, P.; Reddy, M. M. K.; Ramteke, V. B.; Rao, B. S. *Anal. Chim. Acta* **2004**, 508, 31–35.
76. Minami, Y.; Yokoi, S.; Setoyama, M.; Bando, N.; Takeda, S.; Kawai, Y.; Terao, J. *Lipids* **2007**, 42, 1055–1063.
77. Parent, A. A.; Anderson, T. M.; Michaelis, D. J.; Jinang, G.; Savage, P. B.; Linford, M. R. *Appl. Surf. Sci.* **2006**, 252, 6746–6749.
78. Crecelius, A.; Clench, M. R.; Richards, D. S.; Parr, V. *J. Chromatogr. A* **2002**, 958, 249–260.
79. Wu, J. Y.; Chen, Y. C. *J. Mass Spectrom.* **2002**, 37, 85–90.
80. Van Berkel, G. J.; Sanchez, A. D.; Quirke, J. M. E. *Anal. Chem.* **2002**, 74, 6216–6223.
81. Luftmann, H. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, 378, 964–968.
82. Hsu, F. L.; Chen, C. H.; Yuan, C. H.; Shiea, J. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 2493–2498.
83. Chai, W.; Leteux, C.; Lawson, A. M.; Stoll, M. S. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 118–125.
84. Lin, S. Y.; Huang, M. Z.; Chang, H. C.; Shiea, J. *Anal. Chem.* **2007**, 79, 8789–8795.
85. Harry, E. L.; Reynolds, J. C.; Bristow, A. W. T.; Wilson, I. D.; Creaser, C. S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, 23, 2597–2604.
86. Van Berkel, G. J.; Kertesz, V. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 4938–4944.
87. Haddad, R.; Milagre, H. M. S.; Catharino, R. R.; Eberlin, M. N. *Anal. Chem.* **2008**, 80, 2744–2750.
88. Van Berkel, G. J.; Llave, J. J.; De Apadoca, M. F.; Ford, M. J. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 479–482.
89. Wu, C.; Dill, A. L.; Eberlin, L. S.; Cooks, R. G.; Ifa, D. R. *Mass Spectrom. Rev.* **2013**, 32, 218–243.
90. Vacík, J.; Barthová, J.; Pacák, J.; Strauch, B.; Svobodová, M.; Zemánek, F. *Přehled středoškolské chemie* 4. vydání Praha, SPN – pedagogické nakladatelství **1999**.
91. Kaftan, F.; Kofroňová, O.; Benada, O.; Lemr, K.; Havlíček, V.; Cvačka, J.; Volný, M. *J. Mass Spectrom.* **2011**, 46, 256–261.
92. Saarela, V.; Haapala, M.; Kostianen, R.; Kotiaho, T.; Franssila, S. *Lab Chip* **2007**, 7, 644–646.

93. Matyash, V.; Liebisch, G.; Kurzchalia, T. V.; Shevchenko, A.; Schwudke, D. *J. Lipid. Res.* **2008**, *49*, 1137–1146.
94. Ford, M. J.; Kertesz, V.; Van Berkel, G. J. *J. Mass Spectrom.* **2005**, *40*, 866–875.
95. Ifa, D. R.; Manicke, N. E.; Rusine, A. L.; Cooks, R. G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 503–510.
96. Takats, Z.; Cotte-Rodriguez, I.; Talaty, N.; Chen, H.; Cooks, R. G. *Chem. Commun.* **2005**, 1950–1952.
97. Gerbig, S.; Takats, Z. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 2186–2192.
98. Deligne, J.; Quennedey, A.; Blum, M. S. The enemies and defense mechanisms of termites; In: *Social Insects, Vol. II*. Hermann, H. R. (ed.); New York, USA, Academic Press **1981**, p. 1–76.
99. Vrkoč, J.; Ubik, K. *Tetrahedron Letters* **1974**, *15*, 1463–1464.
100. Šobotník, J.; Weyda, F.; Hanuš, R.; Kyjaková, P.; Doubský, J. *Eur. J. Entomol.* **2004**, *101*, 153–163.